

# **Regulation und Funktion immunmodulatorischer Adipokine und Zytokine im Kontext von Fettzellbiologie**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –  
Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Andreas Schmid

aus Amberg

im Januar 2014

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2011 bis Januar 2014 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler.

Promotionsgesuch eingereicht am 14.01.2014

Kolloquium am 29.04.2014

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
	Erstgutachter:	Prof. Dr. Christa Büchler
	Zweitgutachter:	Prof. Dr. Richard Warth
	Dritter Prüfer:	Prof. Dr. Jens Schlossmann

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Ursachen und Erscheinungsformen des Metabolischen Syndroms</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das Fettgewebe</b>	<b>2</b>
1.2.1 Vorkommen, primäre Funktion und Zusammensetzung des Fettgewebes	2
1.2.2 Morphologie und Zellbiologie der Fettzelle	3
1.2.3 Lipidstoffwechsel	5
1.2.4 Funktion des Fettgewebes als endokrines Organ	6
1.2.5 Inflammation im Kontext des Metabolischen Syndroms	7
<b>1.3 Adipokine und Zytokine</b>	<b>8</b>
1.3.1 Die Proteinfamilie der CTRPs	8
1.3.2 Inflammatorische Proteine	12
<b>1.4 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>17</b>
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Chemikalien	19
2.1.4 Kit-Systeme	21
2.1.5 Puffer und Lösungen	21
2.1.6 Enzyme	27
2.1.7 Antikörper	27
2.1.8 Zellkultur	28
2.1.9 Plasmide	31
2.1.10 Oligonukleotide	31
2.1.11 siRNA-Sequenzen	32
2.1.12 Humane Protein- und RNA-Extrakte	33
2.1.13 Humane Blut- und Serumproben	33

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
2.2.1	Kultivierung von Zellen	34
2.2.2	Arbeiten mit DNA	36
2.2.3	Arbeiten mit RNA	41
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	44
2.2.5	Rekombinante Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	48
2.2.6	Tierexperimente	52
2.2.7	Statistische Auswertungen	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Adipozytäre und zirkulierende Konzentrationen von Chemerin, IL-8 und CCL2 bei Hyperlipidämie</b>	<b>53</b>
3.1.1	Einfluss von freien Fettsäuren auf Chemerin, IL-8 und CCL2 im Überstand von 3T3-L1 Adipozyten	53
3.1.2	Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches Chemerin	56
3.1.3	Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches IL-8	64
3.1.4	Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches CCL2	65
3.1.5	Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches CTRP-3	67
<b>3.2</b>	<b>Versuche zur anti-inflammatorischen Wirkung von CTRP-3 <i>in vivo</i></b>	<b>68</b>
3.2.1	Genexpression und Serumspiegel LPS-induzierter pro-inflammatorischer Proteine nach intraperitonealer Injektion von CTRP-3 in der Maus	69
3.2.2	Genexpression und Serumspiegel LPS-induzierter pro-inflammatorischer Proteine nach intravenöser Injektion von CTRP-3 in der Maus	71
3.2.3	Inhibition der LPS-induzierten Aktivierung von Erk1/2 in murinem epididymalem Fettgewebe durch CTRP-3	72
<b>3.3</b>	<b>Versuche zur rekombinanten Expression der globulären Domäne von CTRP-3 (gCTRP-3) in eukaryotischen Zellen</b>	<b>73</b>
3.3.1	Expressionsversuche von gCTRP-3 in H5 Zellen	74
3.3.2	Expressionsversuche von gCTRP-3 in HEK293T/17 Zellen	76
<b>3.4</b>	<b>Expression und Funktion von CTRP-5 in Adipozyten</b>	<b>77</b>
3.4.1	Expression von CTRP-5 mRNA in murinem Fettgewebe und in 3T3-L1 Adipozyten	77
3.4.2	CTRP-5 Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten	78

---

3.4.3	Expression von CTRP-5 in primären humanen Präadipozyten und Adipozyten	79
3.4.4	siRNA vermittelter CTRP-3 <i>knockdown</i> : Einfluss auf die Expression von CTRP-5 in 3T3-L1 Adipozyten	80
3.4.5	Einfluss von CTRP-5 auf die Adipokin-Sekretion aus 3T3-L1 Adipozyten	81
3.4.6	CTRP-5 Expression in 3T3-L1 Adipozyten unter dem Einfluss von freien Fettsäuren	83
3.4.7	Zirkulierendes CTRP-5 in humanem Serum	84
3.4.8	Genotypisierung des SNP rs9640 (T/A) in gesunden Probanden und in Diabetikern	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Adipozytäre und zirkulierende Konzentrationen von Chemerin, IL-8 und CCL2 bei Hyperlipidämie</b>	<b>87</b>
<b>4.2</b>	<b>Versuche zur anti-inflammatorischen Wirkung von CTRP-3 <i>in vivo</i></b>	<b>90</b>
<b>4.3</b>	<b>Versuche zur rekombinanten Expression der globulären Domäne von CTRP-3 (gCTRP-3) in eukaryotischen Zellen</b>	<b>91</b>
<b>4.4</b>	<b>Expression und Funktion von CTRP-5 in Adipozyten</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge</b>	<b>97</b>
<b>6.1</b>	<b>Publikationen</b>	<b>97</b>
6.1.1	Erstautorenschaften	97
6.1.2	Koautorenschaften	97
<b>6.2</b>	<b>Kongressbeiträge</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	<i>acetyl-coA carboxylase</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Akt	Protein Kinase B (PKB)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
AMV-RT	<i>Avian Myoblastosis Virus Reverse Transcriptase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>Bicinchoninic Acid</i> )
BMI	Körpermassenindex (kg/m <sup>2</sup> ) ( <i>Body Mass Index</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
bzgl.	bezüglich
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL2/3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2/3</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
C/EBP $\alpha/\beta/\delta$	<i>CCAAT/enhancer Binding Protein alpha/beta/delta</i>
Cp	<i>Crossing Point</i>
CRP	<i>C-reactive Protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTRP	<i>Clq/TNF related protein</i>
d	Tag
D	Typ 2 Diabetiker
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Erk1	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (p44)</i>
Erk2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 (p42)</i>
et al.	Et alii (lat.: und andere)
EtOH	Ethanol

---

E <sub>x</sub>	Extinktion bei Wellenlänge x
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FFA	freie Fettsäure ( <i>Free Fatty Acid</i> )
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
ggf.	Gegebenenfalls
GLUT 4	Glukosetransporter 4
Gly	Glyzin
h	Stunde
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
hm	human
HMW	<i>High Molecular Weight Form</i>
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
i. d. R.	in der Regel
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Ktrl.	Kontrolle
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight Form</i>
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
M	molar (mol/l)
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MetS	Metabolisches Syndrom
mg	Milligramm
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
min	Minute
MIP-2	<i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μM	mikromolar (μmol/l)
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH/H <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n. s.	nicht signifikant
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
OLI	<i>oral lipid ingestion</i>
p	<i>propability</i> (hier: Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art)

---

pAK	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBST	PBS mit Tween®20
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pg	Pikogramm
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Korrelationskoeffizient
rev	<i>reverse</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLT	<i>RNeasy Lysis Buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SIRS	<i>severe inflammatory response syndrome</i>
SVC	<i>stromal vascular cells</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Trispuffer ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethyldiamin
TG	Triglyzerid
TNF $\alpha$	<i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
TRIzol	Reagenz für <i>guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction</i>
U	Unit
u. a.	unter anderem/n
UCP-1	<i>uncoupling protein-1</i>
uni	<i>universe</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche mit
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
w/v	<i>weight per volume</i> (Massenprozent)



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Ursachen und Erscheinungsformen des Metabolischen Syndroms

Seit den erstmaligen Beschreibungen des gemeinsamen Auftretens der Symptome des Metabolischen Syndroms (MetS) in den 1960er Jahren und der Prägung dieses Terminus in den 1970er Jahren war und ist dieses Konglomerat kardiometabolischer Risikofaktoren Gegenstand sehr intensiver Forschung, wie die mittlerweile über 45000 bei NCBI PubMed gelisteten Publikationen aus dem Themenbereich bezeugen. Nach lange anhaltenden kontroversen Diskussionen über die Symptomatik werden nach heutigem Konsens viszerale Adipositas, Dyslipidämie (Hypertriglyzeridämie und erniedrigtes HDL-Cholesterin), Bluthochdruck und verringerte Glukosetoleranz (aufgrund erhöhter Insulinresistenz) bzw. Typ 2 Diabetes als wesentliche diagnostische Kriterien des MetS verstanden [1] und die Krankheit durch gleichzeitiges Vorliegen von mindestens dreien dieser Symptome definiert.

Für die vergangenen Jahrzehnte ist ein häufiger werdendes Auftreten des MetS insbesondere in den Bevölkerungen der Industrie- und in zunehmendem Maße auch der Schwellenländer zu konstatieren [2, 3]. Diese Entwicklung ist eng verbunden mit der hohen Prävalenz von Übergewicht ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) und Adipositas ( $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) in den betroffenen Gesellschaften [4]. Als Ursache wird vorrangig eine hyperkalorische, fettreiche Ernährung im Verbund mit einer geringen physischen Aktivität beinhaltenden Lebensstil angesehen [5]. Daneben ist auch weiteren Einflüssen wie genetischer Prädisposition [6] und frühkindlicher Entwicklung [7] eine wichtige Rolle zuzuschreiben.

Eine den Verbrauch deutlich übersteigende Fettaufnahme hat morphologische Veränderungen im Fettgewebe zur Folge, es kommt zur Vermehrung (Hyperplasie) oder, infolge vermehrter intrazellulärer Einlagerung von Triglyzeriden, zu einem Größenwachstum (Hypertrophie) der Adipozyten und in der Konsequenz zu einer Vergrößerung des subkutanen und viszeralen Fettgewebes. Das bewirkt Veränderungen im Sekretionsprofil der Adipozyten und begünstigt als Folgeerkrankungen die Entstehung von Insulinresistenz und Glukoseintoleranz sowie die Etablierung eines chronischen Zustandes leichter bis mäßig starker Inflammation [8-10].

## 1.2 Das Fettgewebe

### 1.2.1 Vorkommen, primäre Funktion und Zusammensetzung des Fettgewebes

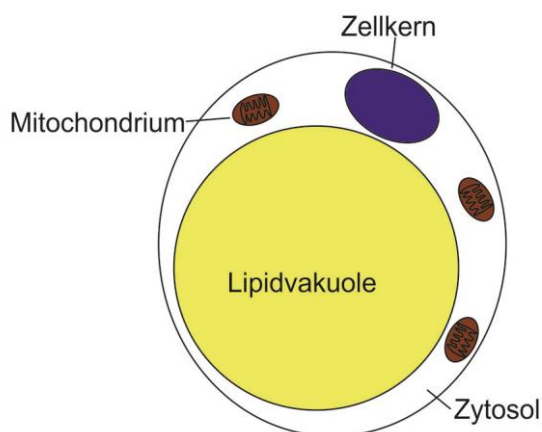
Im Gegensatz zu anderen Organen liegt das Fettgewebe nicht zusammenhängend vor, sondern ist über den Körper verteilt und weist keine definierte Form auf. Nach ihrer jeweiligen Lage lassen sich subkutanes und viszerale Fettgewebe unterscheiden. Die inneren Organe auskleidende Fettpolster wie das perirenale Fett werden aufgrund ihrer mechanisch stabilisierenden Wirkung auch als Baufett bezeichnet. Neben der räumlichen Verteilung ist aufgrund funktioneller und zellmorphologischer Kriterien zwischen braunem und weißem Fettgewebe zu differenzieren. Neben dem Beitrag zur Wärmeisolation des Körpers fungiert das beim erwachsenen Menschen bei Weitem überwiegende weiße Fettgewebe vorrangig als Speicherorgan für Triglyzeride, die in die Fetttropfchen der Adipozyten eingelagert werden. Aufgrund ihres hohen Reduktionsgrades stellen diese Lipide ideale Energiespeicher-Moleküle von hohem Brennwert und mit geringen räumlichen Ansprüchen dar. Bei Energiebedarf können die gelagerten Triglyzeride durch Lipasen gespalten und die dabei freigesetzten freien Fettsäuren in die Blutbahn abgegeben und in die Leber exportiert werden. In den Hepatozyten werden die langkettigen Alkylreste im Prozess der  $\beta$ -Oxidation sukzessive abgebaut und das entstehende AcetylCoA anschließend über Citrat-Zyklus und Atmungskette zur Energiegewinnung weiter oxidiert.

Die Adipozyten des braunen Fettgewebes hingegen nehmen primär keine speichernde Funktion wahr, sondern haben im Gegensatz zu den weißen Fettzellen einen sehr hohen Stoffumsatz und fungieren als Organe der Thermogenese [11, 12], die unter Inaktivierung der oxidativen Phosphorylierung durch alternative Freisetzung der metabolischen Energie als Wärme zustande kommt.

Die zelluläre Zusammensetzung des Fettgewebes ist sehr heterogen. Adipozyten machen i. d. R. etwa 50% seiner Zellen aus [13], dazu kommen die Zellen der stromavaskulären Fraktion (*stromal vascular cells*, SVC). Hierzu zählen Bindegewebszellen, glatte Muskelzellen der Blutgefäße, Leukozyten, Zelltypen des Immunsystems (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen), unausgereifte Präadipozyten sowie mesenchymale Stammzellen [14] in jeweils variierenden Mengenanteilen.

### 1.2.2 Morphologie und Zellbiologie der Fettzelle

Der Adipozyt als häufigster und optisch prägender Zelltyp des Fettgewebes besitzt ein sehr charakteristisches, von einem oder wenigen großen weißen Lipidtropfen dominiertes Erscheinungsbild (Abb. 1). Diese Lipidvakuolen füllen in den meisten Fällen und vor allem in älteren Adipozyten den größten Teil des Zytosols aus [15], die übrigen Organellen sowie der Zellkern sind i. d. R. in der Zellperipherie lokalisiert („Siegelring-Zellen“). Der hohe Anteil der Vakuolen mit den darin enthaltenen, zu Triglyzeriden veresterten Phospholipiden am Zellvolumen verweist auf die augenscheinlich vorrangige Funktion des Adipozyten als Speicherort stark reduzierter und somit sehr energiereicher Stoffwechselmoleküle. Einen Sonderfall stellen die Zellen des braunen Fettgewebes dar, die mehrere kleinere Fetttröpfchen enthalten und aufgrund der großen Zahl an Mitochondrien [12, 15] dunkler und bräunlich erscheinen. Das zahlreiche Vorkommen dieser Organellen in den braunen Adipozyten entspricht deren hoher Stoffwechselaktivität, insbesondere hinsichtlich der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren zum Zweck der Thermogenese. Durch das in braunen Fettzellen stark exprimierte *uncoupling protein-1* (UCP-1) werden die Reaktionen der mit dem Citrat-Zyklus verbundenen Atmungskette von der ATP-Synthese entkoppelt [11], anstatt der Bildung einer Phosphorsäureanhydrid-Bindung wird die aus der Oxidation der Reduktionsäquivalente  $\text{FADH}_2$  und  $\text{NADPH/H}^+$  gewonnene Energie in Form von Wärme freigesetzt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung eines reifen weißen Adipozyten mit einem einzelnen Fetttröpfchen.

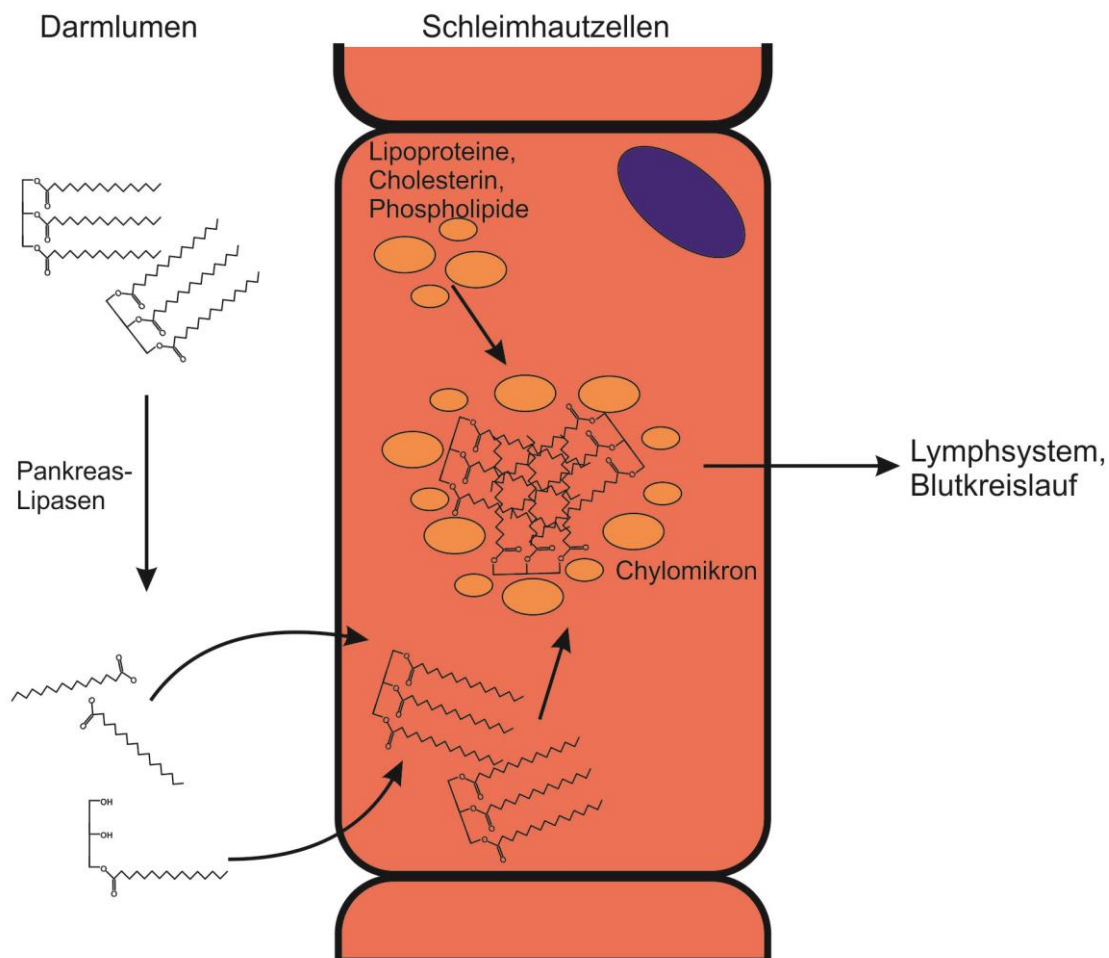
Reife Fettzellen sind hochgradig spezialisierte, nicht mehr teilungsfähige Zellen. Sie entstehen aus ihren Vorläuferzellen, den mitotisch aktiven Präadipozyten, über den Prozess

der Differenzierung. Dieser wird intrazellulär über die Expression bestimmter Gruppen von Genen induziert und reguliert. Während der initialen Phase werden die Transkriptionsfaktoren *CCAAT-enhancer binding proteins* (C/EBP)  $\beta$  und  $\delta$  aus der Klasse der *basic-leucine zippers* [16] verstärkt exprimiert [17]. Die Synthese von C/EBPs unterliegt einer starken Regulation auf transkriptioneller Ebene, wobei cAMP als Aktivator der Transkription von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  eine bedeutende Rolle zukommt [18]. Des Weiteren existieren multiple Isoformen dieser Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlich starker Aktivität, sodass das jeweilige Mengenverhältnis der exprimierten Isoformen eines C/EBP großen Einfluss auf die Regulation der Zielgene hat. C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  transaktivieren die Expression von *peroxisome-proliferator activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ), einem Transkriptionsfaktor aus der Familie der *nuclear hormone receptors*. Die beiden bekannten Isoformen von PPAR $\gamma$  binden ihre Ziel-DNA unter Bildung von transkriptionell aktiven Heterodimeren mit *retinoid X receptor  $\alpha$*  (RXR $\alpha$ ). Auf diese Weise wird die Expression aktiver Zielgene in der adipozytären Differenzierung induziert. Darunter befindet sich auch C/EBP $\alpha$ , das mit PPAR $\gamma$  in einem wechselseitig aktivierenden Verhältnis in Form einer positiven Rückkopplung steht und den Differenzierungsprozess auf transkriptioneller Ebene unterstützt [19]. Eine wichtige Rolle kommt in diesem Kontext außerdem den Proteinen *sterol responsive element binding protein 1c* (SREBP1c; alternativer Name: *adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1/ADD1*) [20], das die transkriptionelle Aktivität von PPAR $\gamma$  erhöht, und *forkhead box C2* (FOXC2) [21] mit seinem aktivierenden Einfluss auf PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  und SREBP1c zu.

Anders als weiße Adipozyten entwickeln sich klassische braune Fettzellen, lokalisiert in definierten anatomischen Bereichen, nicht aus Präadipozyten, sondern gehen aus bestimmten mesenchymalen Vorläuferzellen hervor, aus denen sich auch Muskelzellen ableiten [22, 23]. Bereits in frühen Studien wurde das Vorkommen von phänotypisch braunen und thermogenen, nicht aus myogenen Vorläufern entstehenden Adipozyten inmitten von weißem Fettgewebe beschrieben. Das Auftreten dieser als *beige* oder *brite* bezeichneten Fettzellen ist durch thermische Stimuli wie eine dauerhaft niedrige Umgebungstemperatur induzierbar [24] und ist möglicherweise auf eine Transdifferenzierung von primär weißen in braune Adipozyten zurückzuführen [25-27]. Einen alternativen Entwicklungsmechanismus der induzierbaren braunen Fettzellen zeigt die kürzlich *in vivo* gemachte Entdeckung von bipotenten Vorläuferzellen auf, die sowohl zu braunen als auch zu weißen Adipozyten differenzieren können [28]. Jüngste Forschungsergebnisse belegen, dass die Differenzierung zu *beige* Adipozyten in Nagetieren durch das Myokin Irisin induziert wird [29].

### 1.2.3 Lipidstoffwechsel

Mit der Nahrung aufgenommene Lipide gelangen hauptsächlich in Form von Triglyzeriden in den Dünndarm, wo sie in mit Hilfe der amphipathischen Gallensalze gebildete Mizellen integriert werden [30]. Aufgrund der dabei fixierten Orientierung der hydrophilen Kopfgruppe mit den Esterbindungen zwischen Carbonsäure und Glyzerin zum umgebenden Darmlumen hin sind diese für Pankreas-Lipasen gut angreifbar und werden in dem durch diese Enzyme katalysierten Vorgang der Lipolyse hydrolytisch gespalten [30, 31]. Die freigesetzten Fettsäuren und Monoacylglycerin werden über die Plasmamembran des den Dünndarm auskleidenden Epithels absorbiert [32]. Nach erneuter Veresterung zu Triglyzeriden in den dortigen Schleimhautzellen bilden die Lipide zusammen mit Apolipoproteinen größere stabile Partikel von etwa 200 bis 500 nm Durchmesser [32]. In diesen als Chylomikronen bezeichneten Lipoproteinpartikeln gelangen die Triglyzeride über das Lymphsystem in den Blutkreislauf [31] (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Lipidtransports vom Dünndarm in den Blutkreislauf.

Nach Bindung der Partikel an außenmembranständige Lipoprotein-Lipasen in den aufnehmenden Geweben werden die Triglyzeride von diesen gespalten und die freien Fettsäuren sowie Monoacylglycerin in das Zellinnere transportiert [32]. In Adipozyten werden die Moleküle erneut verestert und die gebildeten Triglyzeride als Speichermoleküle in die Lipidtropfen eingelagert [33].

Beim Abbau der Lipide zur Energiegewinnung erfolgt als initialer Schritt die Lipolyse unter Freisetzung von Fettsäuren und Glycerin. Die Carbonsäuren werden an Ort und Stelle abgebaut oder in den Blutkreislauf abgegeben und gelangen dort, an Serumalbumin gebunden, in die verbrauchenden Gewebe. Glycerin wird in der Leber, dem zentralen stoffwechselaktiven Organ des Körpers, aus dem Blut absorbiert und kann dort als Zwischenprodukt in die Prozesse von Glykolyse oder Gluconeogenese eingeschleust werden [34]. Die freien Fettsäuren werden durch Bildung einer Thioesterbindung mit Coenzym A aktiviert und gelangen nach Bindung an Carnitin in die mitochondriale Matrix, wo die Acylketten im Prozess der  $\beta$ -Oxidation sukzessive zu kürzeren energiereichen Verbindungen, überwiegend zu AcetylCoA, abgebaut werden [35]. Diese Produkte finden Eingang in zentrale Stoffwechselwege wie den Citrat-Zyklus [36]. Die in der im Zuge der Oxidation von AcetylCoA stattgefundenen Reduktion von  $\text{NAD}^+$  und FAD gespeicherte Energie wird in den Prozessen der Atmungskette zur Bildung energiereicher Phosphoanhydrid-Bindungen in den Adenin-Nukleotiden ADP und ATP genutzt [37, 38].

#### 1.2.4 Funktion des Fettgewebes als endokrines Organ

Neben den unter 1.2.3 erläuterten Funktionen als Energiespeicher oder, im Falle der braunen Adipozyten, als Ort der Thermogenese kommt dem Fettgewebe auch eine lange Zeit unterschätzte und im Laufe der vergangenen Jahrzehnte immer besser erforschte Bedeutung als endokrines Organ zu [39]. Mittlerweile wurde eine Reihe von Adipozyten oder Zellen der stromavaskulären Fraktion sezernierter und im Blut zirkulierender Proteohormone mit auto-, para- und/oder endokriner Wirkung identifiziert und charakterisiert. Ein prominenter Vertreter dieser Gruppe ist insbesondere das als „Sättigungshormon“ bekannt gewordene Leptin [40], das eine zentrale Rolle in der Regulation des Essverhaltens und somit der Balance von Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch spielt. Weitere gut erforschte Adipokine sind *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI1) als Inhibitor der Fibrinolyse [39], die in die Entwicklung von Insulinresistenz involvierten Hormone *retinol binding protein 4* (RBP4) [41], Lipocalin-2 [42], Resistin [43] und Adiponektin [40, 44] sowie die inflammatorisch wirksamen Faktoren *interleukin-6* (IL-6) [45] und *tumor necrosis factor* (TNF) [45]. Ein

weiteres, erst seit relativ kurzer Zeit bekanntes Adipokin mit einer möglicherweise bedeutsamen Rolle im MetS ist Visfatin [46, 47].

### 1.2.5 Inflammation im Kontext des Metabolischen Syndroms

Eine Hypertrophie von Adipozyten geht einher mit einer erhöhten Expression pro-inflammatorischer Adipokine, insbesondere werden vermehrt die Zytokine IL-6 und TNF sowie das Chemokin *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2) in den Blutkreislauf abgegeben [10, 45]. Letzteres aktiviert die Migration von zirkulierenden Monozyten, deren Infiltration in das Fettgewebe und ihre Differenzierung zu Makrophagen [48]. Diese stimulieren durch die Sekretion von TNF und CCL2 neben der Rekrutierung weiterer Monozyten auch die Expression und Freisetzung von CCL2, IL-6, *interleukin-8* (IL-8) und weiteren in den Entzündungsprozess involvierten Faktoren aus Adipozyten und den SVC. Das auf diese Weise entstehende Wechselspiel gegenseitiger Induktion von pro-inflammatorischer Genexpression in den verschiedenen Zelltypen des Fettgewebes fördert die Ausbreitung und Etablierung eines chronischen lokalen Entzündungszustandes in einem autokatalytischen Prozess [48]. Infolge der Sekretion in den Blutkreislauf findet dieser seinen Niederschlag in erhöhten Serumkonzentrationen zirkulierender inflammatorischer Adipokine und Zytokine [49] und entfaltet systemische Wirkung, d. h. hat Einfluss auf metabolische und zellbiologische Prozesse in anderen Geweben und Organen, insbesondere in der Leber [50, 51] und in der Muskulatur [52]. In der Konsequenz können u. a. Insulinresistenz und Glukoseintoleranz entstehen und sich im Krankheitsbild von Typ 2 Diabetes manifestieren [53].

Neben den erwähnten Entzündungsfaktoren sind auch einige anti-inflammatorisch wirksame Adipokine bekannt, v. a. die beiden paralogen (d. h. aus einem gemeinsamen Vorläufer infolge einer Verdopplung des betreffenden Gens entstandenen) Proteine Adiponektin [54] und *C1q/TNF-related protein-3* (CTRP-3) [55]. Erstes ist ein Suppressor der Expression pro-inflammatorischer Zytokine, und seine zirkulierende Konzentration ist negativ korreliert mit der Ausprägung von metabolisch induzierter Entzündung [56]. CTRP-3 entfaltet basale anti-inflammatorische Wirkung durch Inhibition diverser auf äußeren Stimuli beruhender Entzündungsprozesse, negative Regulation der zu Grunde liegenden Genexpression und durch Induktion von Adiponektin [57, 58].

## 1.3 Adipokine und Zytokine

### 1.3.1 Die Proteinfamilie der CTRPs

Die CTRPs (*C1q and TNF-related proteins*) bilden eine Genfamilie aus bisher 16 identifizierten, zueinander paralogen Mitgliedern. Die molekularen Strukturen der Proteine folgen einem gemeinsamen, modular gegliederten Grundbauplan, in dem sich an ein N-terminales Signalpeptid eine kurze variable Region, eine längere kollagen-ähnliche Sequenz sowie eine globuläre Domäne am C-Terminus anschließen. Dieser Aufbau ist homolog zu dem des Komplementfaktors C1q, einem Protein von zentraler Bedeutung an der Schnittstelle von angeborenem und erworbenem Immunsystem [59]. Die C-terminale Domäne der CTRPs weist in seiner dreidimensionalen Struktur eine sehr hohe Übereinstimmung mit der *TNF homology domain* (THD) der TNF-Genfamilie auf.

Wie das Vorläuferprotein C1q lagern sich die Mitglieder der CTRP-Familie unter physiologischen Bedingungen zu stabilen, biologisch aktiven homo- und teilweise heterotrimeren Quartärstrukturen zusammen [59], von deren charakteristischem Aussehen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Bezeichnung „Tulpenproteine“ abgeleitet wurde. Darüber hinaus kommt es durch Verknüpfung mehrerer trimerer Grundformen über Disulfid-Brücken zur Ausbildung größerer Proteinaggregate. Bei zirkulierenden CTRPs treten diese *high molecular weight* (HMW)-Strukturen i. d. R. als mengenmäßig häufigste Form im Blutserum auf. Wie Beobachtungen an Adiponektin nahe legen, unterscheiden sie sich sehr wahrscheinlich in Funktionalität und Wirkungsgrad von den Trimeren und kleineren Oligomeren [60, 61].

Das 1995 erstmals beschriebene Adiponektin [62], der bei Weitem prominenteste Repräsentant der Familie, ist ein aufgrund seiner auf Adipozyten beschränkten Expression sehr früh als Adipokin charakterisiertes Protein. Durch die kristallographische Aufklärung seiner Struktur [63] konnte belegt werden, dass die TNF-Liganden und die C1q-Komplement-Komponenten aus einem primordialen Erkennungsmolekül des innate Immunsystems hervorgegangen sind. Seine regulatorischen Funktionen in diversen metabolischen und physiologischen Prozessen wurden in einer Vielzahl von Studien untersucht. Gut charakterisiert ist u. a. seine anti-inflammatorische und die Insulinsensitivität fördernde Wirkung im Kontext des MetS [64, 65]. Es wurden verringerte Konzentrationen von zirkulierendem Adiponektin bei übergewichtigen Menschen und Diabetikern sowie negative Korrelationen mit den Serumspiegeln diverser inflammatorischer Parameter wie *C-reactive*



*protein* (CRP) und TNF festgestellt [66, 67]. Seine entzündungshemmenden Eigenschaften und seine therapeutische Verwendbarkeit wurden in Modellen für Inflammation und metabolische Dysfunktionen *in vivo* untersucht und beruhen u. a. auf Inhibition der Expression pro-inflammatorischer Faktoren [68-70]. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Modifikation von Makrophagen, wobei der Schwerpunkt ihrer Proteinsynthese auf entzündungshemmende Zytokine verschoben und ihre Infiltration in das Fettgewebe unterbunden wird [70]. Im Rahmen anderer, nicht metabolisch induzierter inflammatorischer Zustände wurden hingegen erhöhte Adiponektinkonzentrationen beobachtet und lassen bislang die Frage ungeklärt, ob es sich hierbei um das Ergebnis kompensatorischer Vorgänge handelt oder ob Adiponektin vielmehr eine ambivalente, potentiell pro-inflammatorische Rolle im Rahmen von Entzündungsprozessen zukommt.

Anders als Adiponektin wird CTRP-1 zwar überwiegend von der stromavaskulären Zellfraktion des Fettgewebes produziert [71, 72], seine Expression erstreckt sich daneben aber auch auf andere Gewebe, u. a. auf Muskeln und Leber [73]. Experimentelle Daten legen eine Induktion der CTRP-1 Synthese im Fettgewebe unter inflammatorischen Bedingungen nahe [71]. CTRP-1 ist ein zirkulierendes Adipokin und hat Einfluss auf die Regulation des Blutzuckerspiegels [72], des Bluthochdrucks infolge von Übergewicht [74] sowie der Blutgerinnung [75].

CTRP-2 wird ebenfalls hauptsächlich von SVC im Fettgewebe gebildet und sezerniert. Zirkulierendes CTRP-2 wirkt in Muskelzellen, wo die Aktivierung von *AMP-activated protein kinase* (AMPK), *acetyl-CoA carboxylase* (ACC) und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) durch heterolog exprimiertes CTRP-2 und die darauf folgende Induktion von Glykogen-Bildung und  $\beta$ -Oxidation freier Fettsäuren nachgewiesen wurden [76].

CTRP-4 wird in Leber und Pankreas sowie in diversen Tumorzelllinien exprimiert. Das rekombinante Protein fördert *in vitro* die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und Signalwege und wirkt anti-apoptotisch [77].

Die Expression von CTRP-6 findet im murinen Organismus hauptsächlich in der Plazenta und in geringerem Umfang auch im Fettgewebe statt und zeigt einen ausgeprägten Sexualdimorphismus mit deutlich höheren Konzentrationen von mRNA und Protein in weiblichen Tieren [72]. Das humane Protein fördert die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins *interleukin-10* (IL-10) in Monozyten [78]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine mögliche Assoziation von CTRP-6 mit Typ 1 Diabetes mellitus [79, 80] sowie mit hepatozellulärem Karzinom [81].

Über die Funktion des in stromavaskulären Zellen sowie in der Lunge exprimierten CTRP-7 ist bislang wenig bekannt, allerdings wurden einzelne Marker und *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) innerhalb des Gens mit Verhaltensstörungen assoziiert [82].

CTRP-8 wird im humanen Organismus in Lunge und Hoden gebildet und wurde im murinen Genom bislang nicht identifiziert [83]. Es bildet neben Homotrimeren auch Heterotrimere mit *C1q-related factor* (CRF), einem überwiegend im Gehirn produzierten Protein, das in seiner molekularen Struktur dem allgemeinen Bauplan der CTRPs folgt und eine hohe Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz von Adiponektin aufweist [84].

Das mit Adiponektin ebenfalls sehr eng verwandte CTRP-9 wird überwiegend von Zellen des Fettgewebes synthetisiert und sezerniert. Das humane Protein tritt in zwei getrennt voneinander kodierten Isoformen A und B auf [83]. Im murinen Organismus hat eine Überexpression von CTRP-9 verringerte Serumspiegel von Glukose und Insulin zur Folge, vermutlich durch eine erhöhte Glukose-Aufnahme in Muskelzellen [85]. In Endothelzellen erfüllt CTRP-9 über die Induktion der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion eine vasorelaxatorische Funktion [86].

CTRP-10 wird v. a. im Gehirn, in der Plazenta und im Auge exprimiert, zu einem geringeren Anteil auch in den SVC des Fettgewebes. Trimere dieses Proteins bilden vermutlich heterooligomere Strukturen mit CTRP-13 [87]. Dieses wird im humanen Organismus überwiegend in den SVC exprimiert, in der Maus stellt auch das Gehirn einen wichtigen Ort seiner Synthese dar. Bei Mäusen wurden deutlich erhöhte Serumkonzentrationen von CTRP-13 in weiblichen Tieren beobachtet [87]. Zirkulierendes CTRP-13 bewirkt eine Verbesserung der basalen wie auch der durch Insulin vermittelten Glukose-Aufnahme in Fett- und Muskelzellen bei gleichzeitiger Suppression der Gluconeogenese [87].

### 1.3.1.1 CTRP-3

Das 2001 als CORS26 beschriebene Adipokin CTRP-3 [88] wird neben den Fettdepots noch in einer Reihe weiterer Gewebe exprimiert, insbesondere in Lunge und Milz [88-90]. Im Fettgewebe wird es sowohl von Adipozyten als auch, zu einem etwas größeren Teil, von den SVC produziert [72]. Seine Expression wird während der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen stark induziert [58] und unterliegt der Regulation durch *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  response element* (PPRE), einen Marker der Adipozyten-Differenzierung [91].

In den vergangenen Jahren wurde die Rolle von CTRP-3 als entzündungshemmender Faktor des Fettgewebes eingehend untersucht. Seine Wirkung beruht auf der Inhibition basaler pro-

inflammatorischer Prozesse in Adipozyten und Monozyten, die durch Fettsäuren, Lipopolysaccharid (LPS) und andere *Toll-like receptor* (TLR)-Liganden induziert werden [58, 92]. CTRP-3 tritt in primären humanen Monozyten ebenso wie in murinen 3T3-L1 Adipozyten und humanen THP-1 Makrophagen als Antagonist von LPS auf und inhibiert die Synthese und Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF [93]. Die Expression des in Monozyten anti-inflammatorisch wirksamen Proteins IL-10 wird hingegen nicht verringert [90]. Die entzündungshemmende Wirkung auf Monozyten beruht zusätzlich auf einer Blockierung sowohl der LPS-induzierten Freisetzung von *migration inhibitor factor* (MIF), CCL2 und *chemokine (C-C motif) ligand 4* (CCL4) als auch der durch Laurinsäure induzierten Sekretion von TNF [58]. Bei primären Monozyten aus Patienten mit Typ 2 Diabetes wurden hingegen keine anti-inflammatorischen Effekte durch dieses Adipokin beobachtet [93]. In Adipozyten übt CTRP-3 zudem einen induzierenden Einfluss auf die Sekretion von Adiponektin und Resistin [57] aus und inhibiert die Freisetzung von CCL2 nach pro-inflammatorischer Stimulation durch die TLR-Liganden LPS, Laurinsäure (beide TLR4), Pam3Cys (TLR1/2) und Poly(I:C) (TLR3) [58]. Diese Befunde wurden mittels eines experimentellen, durch *small-interference RNA* (siRNA) vermittelten *knockdown* von CTRP-3 in Adipozyten bestätigt. *In vitro* Experimente unter Verwendung des Fusionsproteins TLR4/MD-2 wiesen darauf hin, dass die anti-inflammatorische Wirkung auf einer Inhibition der LPS-Bindung an TLR4, ohne direkte Interaktion zwischen CTRP-3 und LPS, beruhen könnte [58].

Die Bedeutung dieses Adipokins für die Entwicklung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen wurde durch einen *knockdown* in 3T3-L1 Zellen während der hormonell induzierten Differenzierung gezeigt, der in einer weniger markanten Ausbildung der phänotypischen Merkmale reifer Adipozyten resultierte, v. a. in einem kleineren Volumen der Lipidtropfen und einer verringerten intrazellulären Triglyzeridkonzentration [58].

Neben seiner Rolle als anti-inflammatorisches Agens und Differenzierungsfaktor hat CTRP-3 auch Einfluss auf den Glukose-Stoffwechsel. Im murinen Modell wurde nach Injektion von CTRP-3 eine von Insulin unabhängige Senkung des Blutglukosespiegels beobachtet [94]. Dieser Effekt beruht auf einer durch Aktivierung der Proteinkinase Akt inhibierten Expression in die Gluconeogenese involvierter Enzyme in der Leber [94].

### 1.3.1.2 CTRP-5

Wie viele andere Vertreter dieser Proteinfamilie wird CTRP-5 in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert, so im Fettgewebe [72, 95], in Epithelzellen des Auges [96, 97] und in Myozyten [98].

Gut erforscht ist seine Rolle in der Entstehung der *late-onset retinal degeneration* (L-ORD), deren Auftreten stark assoziiert ist mit einem auf eine Punktmutation zurückzuführenden Aminosäureaustausch (Ser163Arg) in der C-terminalen globulären Domäne von CTRP-5 [96, 97, 99, 100]. Dieser bedingt eine veränderte Proteinfaltung sowie die Ausbildung abnormaler oligomerer Strukturen und beeinträchtigt die Aktivität und Lebensdauer des Proteins [97, 101].

CTRP-5 wird sezerniert und zirkuliert im Blutstrom, wo es in Form von Homotrimeren und größeren Oligomeren vorliegt [72]. In Mäusen wurde die höchste Expressionsrate in den Zellen der stromavaskulären Fraktion des Fettgewebes gefunden. Weibliche Tiere weisen höhere Serumkonzentrationen von CTRP-5 auf als Männchen, des Weiteren wurden erhöhte Werte in übergewichtigen und diabetischen Tiermodellen beschrieben [98].

In Muskelzellen verstärkt CTRP-5 die Glukose-Aufnahme und Fettsäure-Oxidation durch Aktivierung der AMPK und der ACC [98]. Die Ergebnisse genetischer und transkriptioneller Studien in humanen Kollektiven legen zudem die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Protein um einen wichtigen Faktor im Kontext des MetS handeln könnte [95].

## 1.3.2 Inflammatorische Proteine

### 1.3.2.1 Die pro-inflammatorischen Faktoren IL-8 und CCL2

Wie oben bereits ausgeführt, resultiert ein kalorischer Überschuss durch aufgenommenes Fett in einer Ausbreitung des Fettgewebes. Diese kann durch Ausbildung zusätzlicher Adipozyten, also Erhöhung der Zellzahl (Hyperplasie), oder durch Vergrößerung der vorhandenen Fettzellen (Hypertrophie) vonstatten gehen. Bei erwachsenen Menschen tritt bei der Fettgewebsexpansion ganz überwiegend der zuletzt genannte Effekt auf, nur bei einer Minderheit kommt es auch in höherem Alter noch zu einer Vermehrung von Adipozyten. In letzteren Fällen liegt meistens eine „gutartige“ Fettleibigkeit vor, ohne negative Begleiterscheinungen wie Inflammation und verminderte Insulinsensitivität [4, 102]. Wenn, wie in den meisten Fällen, die Ausdehnung des Fettgewebes mit einer Hypertrophie der Adipozyten einhergeht, kommt es in den vergrößerten Fettzellen zu grundlegenden

Veränderungen in Genexpression und Stoffwechsel. Neben der Erhöhung der Lipolyse und des Exports von freien Fettsäuren verschiebt sich der Schwerpunkt von Transkription und Proteinsynthese hin zu pro-inflammatorischen Faktoren [10], deren vermehrte Sekretion parakrine und endokrine Konsequenzen haben kann.

Zu den unter diesen Bedingungen des MetS, namentlich der adipozytären Hypertrophie und Expansion des Fettgewebes, in erhöhten Konzentrationen zirkulierenden sekretorischen Proteinen zählen IL-8 und CCL2 [103]. Als bedeutende Quelle für diese beiden pro-inflammatorischen Faktoren wird in diesem Zusammenhang das Fettgewebe vermutet, und ihre Sekretion wird durch TNF $\alpha$  induziert [104]. Dabei verweisen experimentelle Daten auf einen Schwerpunkt der lokalen Expression von CCL2, IL-8 und anderen inflammatorischen Parametern in anderen Zelltypen als Adipozyten [105]. Beide Zytokine wirken über ihre Rezeptoren *chemokine (C-C motif) receptor 2* (CCR2, Rezeptor für CCL2) und *chemokine (C-X-C motif) receptor 2* (CXCR2, Rezeptor für IL-8) stimulierend auf die Migration von Monozyten [106, 107] und spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei deren Infiltration in das Fettgewebe. Darüber hinaus induzieren sie die pro-inflammatorische Aktivierung von Makrophagen, deren vermehrte Sekretion von TNF wiederum die Produktion von CCL2 und IL-8 in Adipozyten und Präadipozyten fördert. Diese positive Rückkopplung begünstigt die Ausbreitung und Erhaltung des Entzündungszustandes [48].

### 1.3.2.2 Chemerin

Das vor wenigen Jahren als Adipokin charakterisierte Protein Chemerin (ältere Bezeichnungen: *retinoic acid receptor responder 2*/RARRES2; *tazarotene-induced gene 2*/TIG2) wird überwiegend im Fettgewebe synthetisiert [108] und von dort in den Blutkreislauf sezerniert, wo es in Serumkonzentrationen zwischen 100 und 300 ng/ml zirkuliert [109, 110]. Beim Export aus der Zelle wird von dem 163 Aminosäuren langen Translationsprodukt das N-terminale Signalpeptid abgespalten, aus dem entstandenen Prochemerin (143 AS) werden durch proteolytische Spaltungen im Blutplasma die biologisch aktiven Formen des Proteins (136, 137 und 138 AS lang) gebildet [111]. Aktiviertes Chemerin spielt eine wichtige Rolle in der Adipogenese und in der Regulation von Adipozyten-spezifischen, in den Glukose- und Lipid-Metabolismus involvierten Proteinen [108]. Experimente in Zellkultur zeigten eine durch Stimulation mit Chemerin herbeigeführte Verbesserung der Aufnahmefähigkeit von Adipozyten für Glukose [112]. Auch aufgrund konträrer Ergebnisse von Studien *in vivo* [113] ist die genaue Bedeutung dieses Adipokins im Kontext von Übergewicht und Typ 2 Diabetes allerdings noch unklar, ebenso die zu Grunde

liegenden Signalwege. In die Richtung einer entzündungsfördernden Rolle Chemerins weisen die durch Bindung an *Chemokine-like receptor 1* (CMKLR1) vermittelte Stimulation der Migration aktivierter Monozyten [111], die Induktion von TLR4 Expression und CCL2 Sekretion in synovialen Fibroblasten [114] sowie positive Korrelationen mit verschiedenen Symptomen des MetS [115] und mit den Serumspiegeln der inflammatorischen Proteine TNF, IL-6 und CRP [116, 117]. Allerdings sind diesbezügliche Zusammenhänge bislang nicht in befriedigender Weise aufgeklärt worden, auch der experimentelle Nachweis einer direkten Einwirkung dieses Adipokins auf die Infiltration des Fettgewebes durch Makrophagen und Lymphozyten steht bislang noch aus. Ferner lieferten Tierexperimente Hinweise auf anti-inflammatorische Effekte [118] des Chemerin/CMKLR1 Signalweges, des Weiteren sind potentiell voneinander abweichende Wirkungen der biologisch aktiven Isoformen von Chemerin nach aktuellem Wissensstand nicht auszuschließen.

#### **1.4 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit**

Die Einflüsse freier Fettsäuren (*free fatty acids*/FFA) auf die Sekretion der inflammatorischen Faktoren Chemerin, IL-8 und CCL2 aus Adipozyten wurden in dem etablierten Zellkultur-Modell hormonell differenzierter 3T3-L1 Zellen untersucht. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Experimente *in vitro* mit den Auswirkungen einer kurzfristig erhöhten Fettsäure-Zufuhr auf die im Blut zirkulierenden Konzentrationen der betrachteten Proteine sollte im Rahmen einer speziellen Fettbelastungsstudie überprüft werden. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Studien zu oraler Fettaufnahme (*oral lipid ingestion*, OLI) und ihren Auswirkungen auf diverse Serumparameter durchgeführt. Bei diesen experimentellen Ansätzen wurde die Fettbelastung i. d. R. durch die Aufnahme auf Milch oder Creme basierender, chemisch nicht exakt definierter Nahrungspräparate herbeigeführt [119, 120], die auch Anteile von Kohlenhydraten und Proteinen enthielten. Da auch diese Nahrungsbestandteile Einfluss auf Serumparameter haben können, stellt die Heterogenität, zumal wenn nicht standardisiert, eine Limitierung für die Aussagekraft der Studien hinsichtlich der auf die Lipid-Aufnahme zurückzuführenden Effekte dar. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer durch die orale Zufuhr von reinen Triglyzeriden und FFA herbeigeführten kurzfristigen Hyperlipidämie auf die Konzentrationen im inflammatorischen Kontext bedeutsamer Adipokine und Zytokine in den Blutseren gesunder Probanden zu analysieren. Zum Ausschluss der erwähnten potentiellen Nebeneffekte und für eine spezifische Zuordnung ggf. zu beobachtender Veränderungen infolge der Lipid-Zufuhr

zielte das Studien-Design der OLI auf die Verwendung eines möglichst reinen, d. h. zucker- und proteinfreien Präparats für die Fettaufnahme ab. Dieses bestand aus einer synthetischen Lipidlösung sowie verschiedenen pflanzlichen Ölen und wies eine definierte Zusammensetzung aus Triglyzeriden und freien Fettsäuren sowie vernachlässigbar geringe Spuren von Proteinen und Kohlenhydraten auf. Besonderes Augenmerk galt bei der Studie den Serumkonzentrationen von CTRP-3, Chemerin, IL-8 und CCL2, deren Beeinflussung durch die OLI sowie ihren Korrelationen miteinander und mit anthropometrischen und physiologischen Parametern.

Ebenfalls im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die bereits bekannte anti-inflammatorische Wirkung des Adipokins CTRP-3 [58, 121], die *in vivo* an einem LPS-induzierten Entzündungsmodell in C57BL/6N Mäusen überprüft werden sollte. Dabei wurde der Einfluss von intraperitonealer (ip) und intravenöser (iv) Applikation von rekombinant exprimiertem CTRP-3 auf die zirkulierenden Konzentrationen der pro-inflammatorischen Proteine IL-6 und *macrophage inflammatory protein 2* (MIP-2) sowie auf deren Genexpression im Fettgewebe untersucht.

In diesem Kontext sollte des Weiteren die C-terminale, globuläre Domäne von CTRP-3 isoliert in H5 Insektenzellen rekombinant exprimiert und nach affinitätschromatographischer Aufreinigung im 3T3-L1 Adipozyten-Modell hinsichtlich anti-inflammatorischer Eigenschaften getestet werden.

Ein weiteres zentrales Vorhaben war die Aufklärung der Rolle des zu CTRP-3 paralogen CTRP-5 in Adipozyten. Wie in 1.3.1.2 ausgeführt wurde, stellt dieses aus dem Fettgewebe sezernierte Protein einen potentiell bedeutsamen Mediator in der Pathophysiologie des MetS dar, insbesondere bzgl. einer Prädisposition für die Entwicklung von Fettleibigkeit, Typ 2 Diabetes und Insulinresistenz. Bislang wurde allerdings noch nicht abschließend gezeigt, dass es sich bei CTRP-5 wie bei den nahe verwandten Proteinen um ein Adipokin im klassischen Sinn handelt, v. a. hinsichtlich seiner Expression im Fettgewebe und der Zirkulation im Blutkreislauf. Zur Klärung dieser Fragestellung sollte das Expressionsprofil von CTRP-5 auf mRNA- und Protein-Ebene in Gesamt-Fettgewebe, in isolierten primären Präadipozyten und Fettzellen sowie in der murinen Zelllinie 3T3-L1 genauer untersucht werden. Des Weiteren wurde das Vorkommen von CTRP-5 in Serumproben von gesunden Individuen überprüft und quantifiziert. Die Rolle des Proteins in der Zellbiologie des Adipozyten wurde v. a. hinsichtlich regulatorischer Interaktionen mit bekannten Parametern

---

untersucht. In früheren Publikationen beschriebene potentielle genetische Assoziationen von CTRP-5 mit den Erkrankungen des MetS sollten in vorhandenen Studienkollektiven geprüft und insbesondere die Häufigkeit und Verteilung des SNP rs9640 bei Diabetikern und bei gesunden Probanden erfasst und analysiert werden.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer (12 x 14 cm) und Zubehör	Bio-Rad
Agarosegelkammer (7 x 15 cm) und Zubehör	Bio-Rad
Analysenwaage ISO 9001	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H + P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
ELISA-Reader	BIO-TEK Instruments GmbH
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Erdgasbrenner	Bochem
Flüssigstickstoffanlage ESPACE 600	AIR LIQUIDE Karyotechnik
Geldokumentation BDA digital mit UV Star 30	Biometra
Geltrockner	Biometra
Gentle MACS Dissociator	Miltenyi
Inkubationsschrank 37°C, 5% CO <sub>2</sub>	Heraeus Instruments
Inkubationsschrank mit Umlaufschüttler SI 500	Stuart
LightCycler® LC Karussell Zentrifuge	Roche
LightCycler® Real-Time RT-PCR Gerät LC2 mit Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Magnetrührer/Heizplatte basic 2	IKH
Mikroskop DM IL und Zubehör	Leica
Mikroskop Axiovert 40 C und Zubehör	Zeiss
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-DI	Millipore
PCR Cycler T-Gradient Thermocycler	Biometra
pH-Meter pH210 Microprozessor	HANNA Instruments
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply Power Pac basic	Bio-Rad
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Schüttelgerät Rotamax 120	Heidolph
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	Bio-Rad
SDS-Gelplatten und Zubehör	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Speed-Vac Alpha RVC	Christ

Sterilisator WTC	Binder
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermomixer Compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments
Trans-Blot Cell Transferkammer	Bio-Rad
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
UV/Vis Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia
Vakuumpumpe BCV 21	Vacubrand
Vortex VTX-3000L	LMS
Wasserbad	GFL
X-Ray Filmkassette (24 x 30 cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,1 mm	Neubauer
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus Instruments
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch (29 mm)	Serva
EDTA Monovette Serumröhrchen	Sarstedt
ELISA-Platte (96 Loch)	Corning Costar®
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell BioScience
Handee™ Mini-Spin Säulchen	Pierce
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran (0,2 µm)	Bio-Rad
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche
MACS CD14 Micro Beads	Miltenyi Biotec
MACS LS magnetische Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Parafilm	American National Can™
Petrischalen (10 x 1,5 cm)	BD Falcon
Petrischalen (15 x 1,5 cm)	BD Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
QIAshredder	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Serologische Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25ml, 50ml)	Sarstedt
Shanddon Coverplate Objektträgerhalterungen	Thermo
Slide-A-Lyzer® Dialyse Kassetten	Pierce
Slide-A-Lyzer® Mini Dialyse Einheiten	Pierce
Sterile Einmalspritzen	BD Plastipak

---

Sterile Filterspitzen (10 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Sterile Filterspitzen (100 µl, 200 µl)	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Sterilfilter (0,22 µm Porengröße)	Nalgene®
Vacutainer™ CPT™ (8 ml)	BD
Vakuum Sterilfiltrationssystem (50 ml, 150 ml, 250 ml)	Millipore
Whatman Filterpapier	VWR
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Loch)	Sarstedt
Zellkulturschalen (10 x 2 cm)	BD Falcon
Zellschaber	Sarstedt

### 2.1.3 Chemikalien

1-kb DNA Molekulargewichtsleiter	Invitrogen
2-Propanol	Merck
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30%)	Bio-Rad
apo-Transferrin	Sigma
APS	Bio-Rad
Ascorbat	Sigma
BacPak™ Complete Medium	BD Biosciences
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Biosafe™ Coomassie	Bio-Rad
Biotin	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA, Fraktion V	Sigma
BSA, Fraktion V	Biomol
Chloramphenicol	Sigma
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Corticosteron	Sigma
CTRP-5 (human, rekombinant)	Biomol
DEPC	Fluka
Desoxycholate	Sigma
Difco™ LB Agar, Miller	BD Biosciences
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad
DMEM (4,5g/l Glukose)	Biochrom AG
EDTA	Merck
Essigsäure (99%).	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Express Five® SFM Medium	Gibco
FCS	Biochrom AG

---

Fetuin	MP
Formaldehydlösung (37%)	Merck
Freie Fettsäuren (Linol-, Öl-, Palmitinsäure)	Sigma
G418 (Geneticin)	InvivoGen
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
IBMX	Serva
Insulin (bovin)	Sigma
LPS ( <i>E.coli</i> serotype 055:B5)	Sigma
Magermilchpulver	Vitalia
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe Universität
Natriumazid	Fluka
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Calbiochem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
NCS	Sigma
NCS	Biochrom
Nukleasefreies Wasser	Promega
Oil Red O	Sigma
Pantothensäure	Sigma
PBS Dulbecco	Biochrom AG
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN
peqGOLD Protein-Marker VI	Peqlab
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
SDS	Merck
SeaKem® GTG® Agarose	Cambrex
SeaKem® LE Agarose	FMC BioProducts
Sf900 II SFM Medium	Gibco
TEMED	Merck
Tris-HCl	Merck
Tris-NH <sub>3</sub>	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween® 20	Sigma
Xylencyanol	Merck
Xylol	Merck

### 2.1.4 Kit-Systeme

Nachfolgend sind die Bezugsfirmen aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme aufgeführt.

BacPAK™ Baculovirus Expressions-System	BD Biosciences
BCA Protein Assay Kit	Pierce
BD Creator™ DNA Cloning Kit	BD Biosciences
BD TALON™ Buffer Kit	BD Biosciences
BD TALON™ Purification Kit	BD Biosciences
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
DryEase® Mini-Gel Drying System	Invitrogen
DuoSet® ELISA Development System human Adiponectin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human CCL2	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Chemerin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human IL-8	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Leptin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System human Lipocalin-2	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse Adiponectin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse CXCL2/MIP-2	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse IL-6	R&D Systems
DuoSet® ELISA Development System mouse Resistin	R&D Systems
ECL Plus Western blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
Human C1q/TNF-related protein-3 ELISA Kit	MyBioSource
Human CTRP-5 competitive ELISA Kit	AdipoGen
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Lipofectamine® 2000 DNA Reagent	Invitrogen
Nampt (Visfatin/PBEF) (human) ELISA Kit	AdipoGen
QIAamp® DNA Blood Midi Kit	Qiagen
QIAprep® Kits	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	Roche

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden in der jeweils angegebenen Zusammensetzung selbst hergestellt. Sie wurden anschließend, sofern nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

### 2.1.5.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

#### Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer), 5-fach:

Tris-NH <sub>3</sub>	54	g
Borsäure	27,5	g
EDTA	4,65	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### Gelladepuffer, 10-fach:

Glycerin (87%)	5,8	ml	
Bromphenolblau	25	mg	
Xylencyanol	25	mg	
	ad 10	ml	0,5 M EDTA-Stammlösung, pH 8,0

Der Puffer wurde anschließend bei 4°C aufbewahrt.

### 2.1.5.2 Lösungen für Arbeiten mit RNA

#### DEPC-Wasser:

DEPC	1	ml
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O

Nach kräftigem Schütteln wurde die Lösung über Nacht bei RT inkubiert und am Folgetag autoklaviert.

#### Ethanol 75%:

Ethanol	75	ml
DEPC-Wasser	25	ml

### 2.1.5.3 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

#### 2.1.5.3.1 Lösungen für die Präparation von Proteinextrakten

#### RIPA-Lysepuffer:

NaCl, 3 M Stammlösung	2,5	ml
Igepal	500	µl
Desoxycholate	0,25	g
SDS, 20%ige Stammlösung	250	µl
Tris, 1 M Stammlösung, pH 7,5	2,5	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

Vor der Verwendung wurde dem Puffer je eine dem Volumen entsprechende Menge an Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugesetzt. Anschließend wurde der Lysepuffer bei 4°C aufbewahrt.

### 2.1.5.3.2 Lösungen für SDS-PAGE

#### SDS-Probenpuffer (2x Lämmli), [122]

Glyzerin (87%)	2	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung, pH 6,8	120	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	1	ml
Bromphenolblau	25	mg
	ad 10	ml ddH <sub>2</sub> O

Für die Elektrophorese wurde der 2x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 mit der aufzutragenden Probe vermischt.

#### SDS-Probenpuffer (5x Lämmli), [122]

Glyzerin (87%)	5	ml
Tris-HCl, 1 M Stammlösung, pH 6,8	600	µl
SDS, 20%ige Stammlösung	2	ml
β-Mercaptoethanol	2,5	ml
Bromphenolblau	25	mg
	ad 10	ml ddH <sub>2</sub> O

Das Mischverhältnis von 5x SDS-Probenpuffer und Probe betrug jeweils 1:4.

#### SDS-Gellaufpuffer, 10-fach:

Glyzin	144	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS, 20%ige Stammlösung	50	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

#### Lösung für 12,5%ige Trenngele:

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	40	ml
Tris-HCl, 1,5 M Stammlösung, pH 8,8	25	ml
SDS, 10%ige Stammlösung	1	ml
ddH <sub>2</sub> O	34	ml

#### Lösung für 10%ige Trenngele:

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	33	ml
Tris-HCl, 1,5 M Stammlösung, pH 8,8	25	ml
SDS, 10%ige Stammlösung	1	ml
ddH <sub>2</sub> O	41	ml

**Lösung für 4,5%ige Sammelgele:**

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	13	ml
Tris-HCl, 0,5 M Stammlösung pH 6,8	25	ml
SDS, 10%ige Stammlösung	1	ml
ddH <sub>2</sub> O	61	ml

Die Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Direkt vor dem Gebrauch wurde die Polymerisierung des Acrylamids durch Zugabe von 10%iger APS-Lösung (Mischverhältnis 1:200) und TEMED (Mischverhältnis 1:250) initiiert.

**2.1.5.3.3 Lösungen zur Silberfärbung von Acrylamidgelen [123]****Fixierlösung:**

Methanol	400	ml
Essigsäure (99%)	100	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**Inkubationslösung:**

Ethanol	300	ml
NaAc x 3 H <sub>2</sub> O	68	g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2	g
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

Die Gebrauchslösung wurde durch Versetzen von 50 ml Inkubationslösung mit 130 µl Glutardialdehyd fertiggestellt.

**Silberlösung:**

AgNO <sub>3</sub>	0,1	g
	ad 100	ml ddH <sub>2</sub> O

Vor dem Gebrauch wurde der Silberlösung Formaldehyd (Mischverhältnis 1:5000) zugegeben.

**Entwicklerlösung:**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5	g
	ad 100	ml ddH <sub>2</sub> O

Vor dem Gebrauch wurde der Entwicklerlösung Formaldehyd zugegeben (Mischverhältnis 1:10000).



**Stopplösung:**

EDTA	14,6	g
	ad 100	ml ddH <sub>2</sub> O

**2.1.5.3.4 Lösungen für Western Blot****Tank-Puffer, 10-fach [124]:**

Glyzin	140	g
Tris-NH <sub>3</sub>	30	g
SDS	5	g
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O

**Wet-Transfer-Puffer:**

Methanol (technisch)	200	ml
Tank-Puffer, 10-fach	80	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**PBST:**

Tween® 20	1	ml
	ad 1 l	PBS

**TBS, pH 7,6, 10-fach:**

Tris-NH <sub>3</sub>	24,2	g
NaCl	80	g
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O

Die Einstellung des pH-Werts erfolgte mit konzentrierter HCl.

**TBS:**

TBS, pH 7,6, 10-fach	100	ml
	ad 1	l ddH <sub>2</sub> O

**TBST:**

Tween® 20	1	ml
	ad 1 l	TBS

**Blockierlösung PBST:**

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml PBST

**Blockierlösung TBST:**

Magermilchpulver	5	g
	ad 100	ml TBST

Frisch hergestellte Blockierlösungen konnten jeweils 1-2 Tage lang bei 4°C aufbewahrt werden.

**Antikörperlösungen:****BSA-PBST:**

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l PBS

**BSA-TBST:**

BSA	7,5	g
Natriumazid	0,5	g
Tween® 20	0,5	ml
	ad 0,5	l TBS

Die Lösungen wurden nach Sterilfiltration bei 4°C aufbewahrt. Die primären Antikörper wurden im jeweiligen Puffer im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

**2.1.5.3.5 Lösungen für ELISAs****Waschpuffer:**

Tween® 20	0,5	ml
	ad 1	l PBS

**Reagent Diluent:**

BSA	1	g
	ad 100	ml PBS

Die BSA-Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

**Substratlösung:**

Die Komponenten A und B (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) des *Substrate Reagent Pack* (R&D Systems) wurden vor dem Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt.

**Stopplösung:**

Schwefelsäure (rauchend)	5,7	ml
	ad 50	ml ddH <sub>2</sub> O

**Verdünnung von Standard, Antikörpern und HRP-Streptavidin-Konjugat:**

Entsprechend dem Hersteller-Protokoll wurden der Standard in Reagent Diluent, Capture AK in PBS, Detection AK und HRP-Streptavidin-Konjugat in Reagent Diluent verdünnt.

**Verdünnung der Proben:**

Alle zu messenden Proben wurden gemäß den Angaben des Herstellers in Reagent Diluent verdünnt.

**2.1.5.4 Lösungen für Oil Red O Färbung****Oil Red O Stammlösung:**

Oil Red O	175	mg
	ad 50	ml 2-Propanol

Die Substanz wurde über Nacht bei 37°C unter Rühren gelöst und nach Sterilfiltration bei 4°C aufbewahrt.

**Oil Red O Färbelösung:**

Oil Red O Stammlösung	9	ml
ddH <sub>2</sub> O	6	ml

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und sterilfiltriert.

**Fixierungs-Lösungen:**

10% Formaldehyd in PBS
60% 2-Propanol in PBS

**2.1.6 Enzyme**

Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Restriktionsenzym <i>Bam</i> H I	Roche
Restriktionsenzym <i>Not</i> I	Roche
Restriktionsenzym <i>Xba</i> I	Roche
T4 DNA Ligase	Metabion
Taq DNA Polymerase	Roche

**2.1.7 Antikörper**

Nachfolgend werden die Bezugsfirmen für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper nebst der jeweiligen Ursprungs-Spezies angeführt.

### 2.1.7.1 Primäre Antikörper

Anti- $\beta$ -Aktin pAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-CORS26 pAK	Kaninchen	Pineda Antikörpersevice
Anti-CTRP-5 pAK	Kaninchen	AdipoGen
Anti-GAPDH mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-His <sub>6</sub> pAK	Maus	GeneTex
Anti-HN <sub>6</sub> pAK	Kaninchen	BD Biosciences
Anti-p44/42 MAPK mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-Phospho-p44/42 MAPK mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Anti-PI3 Kinase p85 pAK	Kaninchen	Upstate
Anti-PPARgamma mAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies

### 2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen HRP-konjugierter AK	Esel	Jackson Immuno Research
Anti-Maus HRP-konjugierter AK	Ziege	Jackson Immuno Research

## 2.1.8 Zellkultur

### 2.1.8.1 Medien für eukaryotische Zellen

#### 2.1.8.1.1 Medien für Insektenzellen

Medium	Supplementation
Express Five™ SFM (H5)	200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
Sf900-Medium II SFM (Sf21)	200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
Sf900-Medium II SFM (Sf21)	10% FCS 200 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
BacPak™ Complete Medium (Sf21)	-

### 2.1.8.1.2 Medien für Säugerzellen

Medium	Supplementation
DMEM (3T3-L1, HEK293T/17) (Anzuchtmedium)	10% NCS 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Differenzierungsmedium I)	5% NCS 17 nM Pantothensäure 10 nM Biotin 2 ng/ml apo-Transferrin 30 ng/ml Fetuin 1 µM Corticosteron (frisch zugesetzt) 200 µM Ascorbat (frisch zugesetzt) 2,5 µM IBMX (frisch zugesetzt) 100 nM Insulin (frisch zugesetzt) 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1) (Differenzierungsmedium II)	1 µM Insulin (frisch zugesetzt) 200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
DMEM/Ham's F-12 (3T3-L1, HEK293T/17) (Kultivierungsmedium)	200 U/ml Penicillin 0,2 mg/ml Streptomycin
PM-1 (primäre humane Präadipozyten)	-
DM-2 (primäre humane Präadipozyten)	-
AM-1 (primäre humane Präadipozyten)	-

### 2.1.8.1.3 Medien für *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Luria-Broth-Flüssigmedium (LB-Medium) bzw. auf Luria-Broth-Agarplatten (LB-Agar).

LB-Medium: 25 g Luria-Broth-Base  
ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

LB-Agar: 25 g Luria-Broth-Agar  
ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

Zur Selektion plasmidtragender Klone wurden dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar nach dem Autoklavieren geeignete Antibiotika zugesetzt. Die Stammlösungen für Ampicillin, Kanamycin (jeweils in ddH<sub>2</sub>O) und Chloramphenicol (in EtOH) wurden dem Medium bzw. dem Agar im Verhältnis 1:1000 zugegeben. Die Endkonzentration im Medium betrug 100 µg/ml für Ampicillin, 50 µg/ml für Kanamycin und 30 µg/ml für Chloramphenicol.

## 2.1.8.2 Organismen

### 2.1.8.2.1 Insektenzellen

Die Kultivierung der verwendeten Insektenzelllinien H5 und Sf21 erfolgte in einem Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 27°C.

Zelllinie	Herkunft
High Five™ (H5)	<i>Trichoplusia ni</i> (Invitrogen)
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> 21 (Invitrogen)

### 2.1.8.2.2 Humane und murine Zelllinien

Nachfolgend sind die verwendeten murinen und humanen Zelllinien aufgeführt. Sämtliche Zellen wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und konstant hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Zelllinie	Herkunft
3T3-L1	murine Fibroblasten (American Type Culture Collection)
HEK293T/17	humane Nierenzellen (American Type Culture Collection)

### 2.1.8.2.3 Bakterien

Die Anzucht der *E. coli* erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C. Sie wurden zur Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Ihre Transformation wurde durch Hitzeschock durchgeführt.

<i>E. coli</i> Stämme	Marker
DH5α-T1 <sup>R</sup>	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ39 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>

### 2.1.9 Plasmide

pDNR-Dual Donor Vector	BD Biosciences
pIRESneo Expression Vector	Clontech
pLP-BacPak9 Acceptor Vector	BD Biosciences

### 2.1.10 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind nachfolgend gelistet und wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen.

#### 2.1.10.1 Primer für die Amplifikation muriner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
β-Aktin_m_uni	CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG	510 bp
β-Aktin_m_rev	CGCACGATTTCCTCTCAGCTG	
CTRP-5_m_uni	GGCGACACCACGAGTTATTT	213 bp
CTRP-5_m_rev	AGCTTTGAATGGCTTCCTCA	

#### 2.1.10.2 Primer für die Amplifikation humaner Gene

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
18S rRNA_h_uni	TCAAGAACGAAAGTCGGAG	489 bp
18S rRNA_h_rev	GGACATCTAAGGGCATCACA	
CTRP3_SigP_uni	GGGGAATTCCATGCTTTGGAGGCAGCTCATC	474 bp
CTRP3_Kopf_XbaI_rev2	GGGTCTAGAAGCTTAGTTTCAAAGAGCAG	
CTRP-5_h_uni	ACCTTCTCCGGATTTCTGGT	174 bp
CTRP-5_h_rev	CCCACCTCCCTAGTCATTCA	
SNP_rs9640_uni	GAGCAACTGGGGGACTTACA	491 bp
SNP_rs9640_rev	GTGAAGAATGGCGAATCCAT	
CTRP3_SigP_uni	GGGGAATTCCATGCTTTGGAGGCAGCTCATC	497 bp
gCTRP3_NotI_His rev	GGGGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGTT AGTTTCAAAGAGCAGGAG	

#### 2.1.10.3 Primer für Real-time RT-PCR

Zur Vermeidung einer Amplifizierung genomischer DNA wurden für die Genexpressionsanalysen jeweils Primerpaare ausgewählt, die ein Intron im Zielgen umspannten. Um die Elongationszeiten möglichst kurz zu halten, wurde dabei auf eine Länge der amplifizierten Fragmente von etwa 300 bp geachtet. Des Weiteren wurden

Oligonukleotide mit einer *Annealing*-Temperatur von ca. 60°C ausgewählt (Roche Applied Science, Universal ProbeLibrary Assay Design Center: [www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp](http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp)).

Die Spezifität der ausgewählten Primerpaare wurde jeweils durch die Sequenzierung der in einem Testansatz erhaltenen PCR-Produkte durch die Firma GeneArt (Regensburg) verifiziert.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Größe
β-Aktin_m_uni	TGGAATCCTGTGGCATCCATG	285 bp
β-Aktin_m_rev	TAAAACGCAGCTCAGTAACAG	
IL-6_m_uni	AGTGGCTAAGGACCAAGACC	140 bp
IL-6_m_rev	TCTGACCACAGTGAGGAATG	
MIP-2_m_uni	TCCAGAGCTTGAGTGTGACG	256 bp
MIP-2_m_rev	AGGCACATCAGGTACGATCC	
CTRP-5_m_uni	GGCGACACCACGAGTTATTT	213 bp
CTRP-5_m_rev	AGCTTTGAATGGCTTCCTCA	
GAPDH_m_uni	TGTCCGTCGTGGATCTGAC	375 bp
GAPDH_m_rev	AGGGAGATGCTCAGTGTTGG	
18S rRNA_m_uni	GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC	217 bp
18S rRNA_m_rev	CATCTAAGGGCATCACAGACC	

### 2.1.11 siRNA-Sequenzen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Silencer® Pre-designed* siRNAs wurden von der Firma Ambion bezogen.

siRNA	Sequenz (5' → 3')	Identifikationsnummer
CTRP-3_sense (murin)	UGGAUUUCGUGGUUACCAAtt	s96249
CTRP-3_antisense (murin)	UUGGUAACCACGAAAUCCAAta	
CTRP-3_sense (murin)	GAUGAAGCAUGAGGACGUAtt	s96250
CTRP-3_antisense (murin)	UACGUCCUCAUGCUUCAUCat	
CTRP-3_sense (murin)	UGUACAGCUAUGAAACAAAtt	s96251
CTRP-3_antisense (murin)	UUUGUUUCAUAGCUGUACAtg	

Als Negativkontrolle zu den genspezifischen siRNAs wurde die *Silencer® Negative Control* #1 siRNA der Firma Ambion verwendet.



### 2.1.12 Humane Protein- und RNA-Extrakte

Um die Expression von CTRP-5 in humanen Präadipozyten und Adipozyten zu analysieren, wurden primäre subkutane Präadipozyten, Proteinextrakt aus Gesamtfettgewebe sowie isolierte RNA aus primären Präadipozyten und Adipozyten (alle von der Firma ZenBio, USA) verwendet.

### 2.1.13 Humane Blut- und Serumproben

#### 2.1.13.1 Serumkollektiv zur oralen Fettbelastung (OLI)

Die am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführte Studie zu oraler Fettbelastung [125] umfasste 100 Probanden ohne bekannte Erkrankungen (42 männlich, 58 weiblich). Die Teilnehmer wurden über die Zielsetzung der Studie sowie über Ablauf und potentielle Risiken der Probenentnahme in Kenntnis gesetzt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission bewilligt. Das Studienkollektiv wurde federführend von Frau Stephanie Leszczak und Frau Irene Ober im Rahmen ihrer Arbeiten zur Dissertation erstellt.

Die Fettbelastung wurde durch orale Aufnahme einer aus drei Komponenten zubereiteten Fettemulsion (84,2 g Lipide in 160 ml; 758,1 kcal) herbeigeführt. Diese war folgendermaßen zusammengesetzt:

Calogen <sup>®</sup> NUTRICIA-Neutral	150 ml	75 g TG
Sonnenblumenöl	5 ml	4,6 g FFS
Oliveöl	5 ml	4,6 g FFS

Den überwiegenden Anteil stellte dabei das Nahrungsergänzungspräparat *Calogen<sup>®</sup>NUTRICIA-Neutral* von Pfrimmer-Nutricia (Erlangen). Dieses war eine aus pflanzlichem Fett hergestellte reine Triglyzerid-Lösung und enthielt in 150 ml 7,95 g gesättigte Fettsäuren, 45,6 g einfach ungesättigte Fettsäuren, 21,45 g mehrfach ungesättigte Fettsäuren, 69 g H<sub>2</sub>O und sehr geringe Spuren von Kohlenhydraten (ca. 0,15 g).

Das zugegebene Sonnenblumenöl enthielt 10,2% gesättigte sowie 26,3% einfach und 63,5% mehrfach ungesättigte FFS, im Oliveöl lagen 14% gesättigte sowie 78% einfach und 8% mehrfach ungesättigte FFS vor.

Die Fettemulsion wurde in nüchternem Zustand (keine Nahrungsaufnahme in den zurückliegenden 12 h) innerhalb von max. 15 min oral aufgenommen, anschließend durften während der folgenden 6 h keine weitere Nahrung verzehrt und nicht mehr als 500 ml H<sub>2</sub>O

getrunken werden. Den Probanden wurde zu Beginn der Studie sowie zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h nach Fettaufnahme Blut abgenommen. Das daraus durch Zentrifugation (10 min bei 4000 rpm) gewonnene Serum wurde für spätere Messungen bei -20°C gelagert.

#### **2.1.13.2 Serumkollektiv zum oralen Glukosetoleranztest (OGTT)**

50 zufällig ausgewählte Proben (23 männlich, 27 weiblich) aus dem am Institut gelagerten und bereits in früheren Publikationen beschriebenen Serumkollektiv [47, 109] zu einem oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT) wurden für die Bestimmung der zirkulierenden Konzentration von humanem CTRP-5 verwendet. Das Studienkollektiv [47] wurde von Frau Dr. med. Josefine Martin im Rahmen ihrer Dissertation generiert.

#### **2.1.13.3 Blutproben zur Genotypisierung hinsichtlich des SNP rs9640**

Im Rahmen der Untersuchungen zu Häufigkeit und Verteilung des SNP rs9640 (T/A) wurde DNA zur Genotypisierung aus den Blutproben von 100 gesunden Spendern (Proben wurden bereitgestellt von Prof. Dr. Aslanidis, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Regensburg) und von 100 Patienten mit Typ 2 Diabetes aus einem am Institut gelagerten Kollektiv isoliert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung von Zellen**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von Insektenzellen**

Insektenzellen der Linien H5 und Sf21 wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen für semi-adhärenzte Zellen mit 10 ml Medium bei 27°C in einem Brutschrank gehalten. H5 Zellen wurden in serumfreiem Express Five-Medium angezogen, die Kultivierung der Sf21 Zellen erfolgte in mit 10% FCS supplementiertem Sf900-Medium. Die Zellen beider Linien setzten sich bei optimalem Wachstum am Boden der Zellkulturflaschen in einer einlagigen Schicht (*Monolayer*) ab. Die Passage erfolgte jeweils nach 3-4 Tagen, wenn bis zu 90% des Flaschenbodens mit Zellen bedeckt waren. Die adhärenzten Insektenzellen wurden durch vorsichtiges Klopfen gelöst, 5 min bei 300 g abzentrifugiert und nach Resuspension in frischem Medium in einem Verhältnis von 1:5 auf neue Flaschen verteilt.

### **2.2.1.2 Kultivierung der murinen Zelllinie 3T3-L1**

Fibroblasten der Zelllinie 3T3-L1 können im konfluenten Zustand zu Adipozyten differenziert werden und sind ein etabliertes und gut charakterisiertes präadipozytäres Zellmodell [126, 127]. Die Differenzierung der Zellen erfolgt durch Zugabe adipogener Substanzen und resultiert in einem primären Adipozyten morphologisch und funktionell sehr ähnlichen Zelltyp [128].

Die Kultivierung von 3T3-L1 Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen für adhärente Zellen mit 12 ml DMEM Medium, das mit 10% NCS supplementiert wurde (siehe 2.1.8.1.2, Anzuchtmedium), im Brutschrank bei konstanten Bedingungen von 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert (bei 80-90% Konfluenz). Durch Zugabe von Trypsin wurden die interzellulären Kontakte während einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C getrennt und die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Nach dem Abbruch der Reaktion durch Zugabe von frischem Medium, wobei Trypsin durch das darin enthaltene NCS inaktiviert wurde, und anschließender Zentrifugation (6 min bei 300 g) wurden die Zellen in Anzuchtmedium resuspendiert und in einem Volumenverhältnis von 1:12 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

#### **2.2.1.2.1 Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten**

3T3-L1 Zellen aus Passage 3 bis 8 wurden in einer Dichte von 5000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in Zellkulturschalen mit frischem Anzuchtmedium ausgesät. Die Induktion der Differenzierung begann am Folgetag (Tag 0 der Differenzierung) durch Entfernung des Anzuchtmediums, das durch Differenzierungsmedium I (siehe 2.1.8.1.2) ersetzt wurde. Dieses wurde an den Tagen 3 und 6 der Differenzierung erneuert. Am Tag 7 wurde ein Mediumwechsel zu Differenzierungsmedium II (siehe 2.1.8.1.2) und am Tag 8 zu serumfreiem Medium (siehe 2.1.8.1.2) vollzogen. Der Erfolg der an Tag 9 abgeschlossenen Differenzierung der Fibroblasten zu reifen Adipozyten wurde durch mikroskopische Kontrolle sowie durch Anfärbung der Lipidtropfen mit Oil Red O verifiziert.

#### **2.2.1.2.2 Stimulation von 3T3-L1 Zellen**

Differenzierte 3T3-L1 Adipozyten wurden am Tag 8 durch Zugabe der jeweiligen Substanz in frisches serumfreies Kulturmedium für die vorgesehene Zeit stimuliert. Zellen und Überstand wurden anschließend geerntet.

### 2.2.1.3 Kultivierung und Differenzierung von primären humanen Präadipozyten

Die verwendeten primären humanen Adipozyten wurden von der Firma BioCat als Präadipozyten bezogen und anschließend *in vitro* nach Angaben des Herstellers zu reifen Fettzellen differenziert. Die Kultivierung der Präadipozyten erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen für adhärente Zellen in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre in PM-1 Medium (*Preadipocyte Medium*) jeweils bis zu einer Konfluenz von etwa 85-90%. Nach Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und passagiert oder in Zellkulturschalen mit PM-1 ausgesät und für 24-48 h bis zum Erreichen einer Konfluenz von 85-90% inkubiert. Die Differenzierung wurde durch einen Mediumwechsel auf DM-2 (*Adipocyte Differentiation Medium*) induziert, in dem die Zellen 7 Tage lang kultiviert wurden. Am Tag 8 wurde das Medium durch eine Mischung (Verhältnis 1:2) aus DM-2 und AM-1 (*Adipocyte Maintenance Medium*) ersetzt. Nach weiteren 7 Tagen in Kultur war die Differenzierung der Zellen zu reifen Adipozyten abgeschlossen.

### 2.2.1.4 Kultivierung der humanen Zelllinie HEK293T/17

Die aus humanen embryonalen Nierenzellen abgeleitete Zelllinie HEK293T/17 ist als Expressionssystem so gut etabliert wie kaum ein anderer Typus von Säugetierzellen und ist insbesondere für die rekombinante Expression von stark glykosylierten Proteinen von Bedeutung. Die adhärenenten HEK293T Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 12 ml DMEM Medium mit 10% NCS bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt, außerhalb der Selektionszeiten mit G418 wurden die Zellen einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 gesplittet. Analog zu den 3T3-L1 Fibroblasten wurde Trypsin (10 min, 37°C) zur Spaltung der interzellulären Kontakte eingesetzt. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in frischem Anzuchtmedium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

## 2.2.2 Arbeiten mit DNA

### 2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus Bakterien wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [129] aus 3 ml einer über Nacht angewachsenen Kultur unter Verwendung des *QIAprep® Spin Miniprep Kits* (Qiagen) isoliert. Die Bakterienzellen wurden durch Zugabe von Natriumhydroxid und SDS

aufgeschlossen und die freigesetzten Proteine und genomische DNA durch Neutralisation gefällt. Die Plasmid-DNA blieb dabei in Lösung und wurde durch Bindung an eine Silikamembran abgetrennt. Nach Auswaschen von Verunreinigungen aus der Silikamatrix wurde die DNA schließlich in großer Reinheit eluiert und konnte für Klonierungs- und Sequenzierungs-Ansätze verwendet werden.

### 2.2.2.2 Präparation von genomischer DNA aus Blutproben

Für die Isolierung und Reinigung von genomischer DNA aus humanen Blutproben wurde das *QIAamp® DNA Blood Midi* Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### 2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung kann aus der gemessenen Extinktion bei 260 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden. Die Messung erfolgte in 1 µl DNA-Lösung an einem NanoDrop-Gerät gegen eine Wasserprobe als Referenz. Unter Einbeziehung des für doppelsträngige DNA spezifischen Extinktionsfaktors von 50 µg ml<sup>-1</sup> ( $\epsilon_{\text{dsDNA}}$ ) wurde dabei die DNA-Konzentration ( $c_{\text{dsDNA}}$ ) nach folgender zu Grunde liegender Formel berechnet:

$$c_{\text{dsDNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{dsDNA}} \cdot V$$

$c_{\text{dsDNA}}$ : Konzentration an dsDNA in der Lösung (µg·ml<sup>-1</sup>)  
 $E_{260}$ : Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm  
 $\epsilon_{\text{dsDNA}}$ : Extinktionskoeffizient von dsDNA, 50 µg·ml<sup>-1</sup>  
 $V$ : Verdünnungsfaktor, hier 1

Durch eine zusätzliche Extinktionsmessung bei 280 nm wird die Reinheit der DNA bestimmt. Bei reiner DNA liegt das Verhältnis von  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  bei etwa 1,8.

### 2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Um die Größe von DNA-Molekülen zu bestimmen, wurden sie auf 1% bis 2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wurde Agarose in entsprechender Konzentration in 1x TBE-Puffer gelöst, bis zum Sieden erhitzt und nach Zugabe von 0,001% (v/v) einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/µl) in eine Gelkammer gegossen. Zur Aussparung von Ladetaschen wurde vor dem Erstarren der erkaltenden

Agarose ein Taschenkamm eingesetzt. Nach Auftragung der mit Ladepuffer versetzten DNA-Proben auf das mit 1x TBE-Puffer bedeckte Gel erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei einer angelegten Spannung von 80 V. Als Größenstandard wurde eine 1 kb-DNA-Leiter verwendet. Die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente waren durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar und konnten fotografiert und bei Bedarf für eine Aufreinigung ausgeschnitten werden.

#### **2.2.2.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

Zur Aufreinigung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die DNA anschließend mit dem *QIAquick® Gel Extraction Mini Elute* Kit gemäß Hersteller-Protokoll aus dem Gel eluiert.

#### **2.2.2.6 Inkubation mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsendonukleasen spalten DNA-Moleküle an definierten Stellen in einem jeweils spezifischen Muster. Die zu schneidende DNA wurde mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen bei 37°C für 60 bis 90 min inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden zur Analyse auf einem Agarosegel aufgetrennt.

#### **2.2.2.7 Inkubation mit Alkalischer Phosphatase**

Zur Vermeidung einer Religation der durch Restriktionsenzyme gespaltenen Plasmide wurden die Ansätze vor der Ligation für 10 min bei 37°C mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Dieses Enzym dephosphoryliert die 5'-Enden der DNA-Fragmente und verhindert dadurch deren neuerlichen Zusammenschluss. Eine anschließende zehnminütige Inkubation der Reaktionsansätze bei 65°C bewirkte eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase und beendete somit die Reaktion.

#### **2.2.2.8 Ligation**

Zur Ligation eines DNA-Fragments mit Vektor-DNA diente die T4-DNA-Ligase. Durch dieses Enzym können DNA-Fragmente sowohl über komplementäre *sticky ends* als auch über *blunt ends* miteinander verbunden werden. Das für die Ligation optimale Verhältnis von

Plasmid-DNA und zu insertierender DNA im Reaktionsansatz liegt üblicherweise bei etwa 1:3. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Insert-DNA	4	µl (ca. 800 ng)
Vektor-DNA	0,5	µl (ca. 150 ng)
5x Ligasepuffer	4	µl
T4-DNA-Ligase	1	µl
ddH <sub>2</sub> O	10,5	µl

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei RT.

#### 2.2.2.9 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Beim Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion findet eine enzymatisch katalysierte, exponentielle Amplifikation von Nukleotidsequenzen statt [130], wodurch bereits geringe Mengen eines DNA-Fragments in einem vielfältigen Gemisch selektiv vervielfältigt werden können.

Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (*Annealing*) und anschließenden Verlängerung (*Extension*) zweier an gegenüberliegende DNA-Stränge in entgegengesetzter Orientierung hybridisierender Primer, deren spezifische Bindungsstellen an den beiden Enden des zu vermehrenden Sequenzabschnitts lokalisiert sind. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (10 min bei 95°C) zur Hitzeaktivierung der verwendeten *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* erfolgte die Amplifikation der DNA in 35-45 jeweils aus Denaturierung, *Annealing* und *Extension* bestehenden Zyklen. In der Phase der Denaturierung (30 s bei 95°C) wurde die DNA in Einzelstränge gespalten, daraufhin hybridisierten die beiden Primer bei verringerter Temperatur an die jeweiligen komplementären Zielsequenzen (*Annealing*; 1 min bei 60-65°C, abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer). Während der *Extension* erfolgte die Synthese des zur DNA-Matrize komplementären DNA-Strangs durch die hitzestabile DNA-Polymerase bei wiederum erhöhter Temperatur (1 min pro kb Fragmentlänge; 72°C). Zur Vervollständigung aller synthetisierten DNA-Stränge diente ein längerer Elongationsschritt am Ende des PCR-Programms (10 min bei 72°C).

Die passende Temperatur für das *Annealing* des in der PCR verwendeten Primerpaars lag jeweils 5°C unter der aus Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotide berechneten Schmelztemperatur. Von großer Bedeutung für eine hohe Effizienz der Bindung an die DNA-Matrize war daher die Auswahl zweier Primer mit möglichst ähnlichen Schmelztemperaturen. Die in der PCR amplifizierten Fragmente wurden auf Agarosegelen analysiert und für eine weitere Verwendung gegebenenfalls aufgereinigt.

### 2.2.2.10 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der Basensequenzen von Klonierungs- und PCR-Produkten wurden Sequenzierungen von der Firma GeneArt (Regensburg) durchgeführt. Dabei kam das von Sanger entwickelte Kettenabbruchverfahren [131] zum Einsatz. Den Sequenzierungsansätzen wurde jeweils ein an das gesuchte DNA-Fragment spezifisch bindender Primer zugesetzt.

### 2.2.2.11 Real-time RT-PCR

Bei einer *Real-time* RT-PCR wird die DNA-Amplifikation einer herkömmlichen PCR zur Quantifizierung spezifischer DNA-Fragmente genutzt. Die Verwendung des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR<sup>®</sup> Green ermöglicht aufgrund der Proportionalität von gemessener Fluoreszenzintensität zur Menge an gebildetem PCR-Produkt die Bestimmung seiner Konzentration. Die Amplifikation der Ziel-DNA wird dabei während des Reaktionsverlaufs verfolgt und die absolute oder relative Menge des analysierten DNA-Fragments in der anfangs eingesetzten Probe anhand einer erstellten Standardkurve berechnet. Die Versuche wurden mit dem *LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR<sup>®</sup> Green I Kit* (Roche) durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Reaktionsmix (Roche)	2	µl
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	2,4	µl
universe Primer, 5 pmol/µl	1	µl
reverse Primer, 5 pmol/µl	1	µl
cDNA	2	µl
ddH <sub>2</sub> O	11,6	µl

Der Reaktionsmix enthielt SYBR<sup>®</sup> Green I, Reaktionspuffer, dNTPs und HotStart Taq-Polymerase. Die Kettenreaktion lief in dünnen Glaskapillaren in einer temperierbaren Reaktionskammer ab.

Das Temperatur-Programm für die RT-PCR begann mit einer Inkubation der Proben für 10 min bei 95°C zur Aktivierung der HotStart Taq-Polymerase. Anschließend lief die PCR in 40-45 Wiederholungen des Amplifizierungszyklus aus den Schritten Denaturierung (95°C 15 s), *Annealing* (60°C, 10 s) und *Elongation* (72°C, 10 s) ab. Die Temperatur für das *Annealing* war jeweils spezifisch für das verwendete Primerpaar und wurde aus seiner Schmelztemperatur berechnet (vgl. 2.2.2.9).

Nach Beendigung der Amplifikation wurde die Reaktionskette mit der Erstellung einer Schmelzkurve abgeschlossen, anhand derer die Bildung eines einzigen spezifischen PCR-Produktes überprüft wurde. Dafür wurde die Nukleinsäure in einem langsamen



Temperaturanstieg (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz erhitzt. Die bei einer spezifisch arbeitenden PCR synthetisierten identischen DNA-Moleküle spalteten sich bei derselben charakteristischen Temperatur in ihre Einzelstränge auf, wobei durch Freisetzung des interkalierenden SYBR<sup>®</sup> Green die messbare Fluoreszenz abrupt abnahm. Im Falle mehrerer während der Reaktion gebildeter DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge waren diese entsprechend anhand ihrer voneinander verschiedenen Schmelztemperaturen zu erkennen.

Um die Konzentration der analysierten cDNA in der eingesetzten Probe berechnen zu können, erfolgte in jedem Amplifikationszyklus im Anschluss an die Elongation eine Messung der Fluoreszenz bei einer vom jeweiligen PCR-Produkt abhängigen Temperatur (75-85°C).

Aus der graphischen Auftragung der erhaltenen Messwerte gegen die absolvierte Anzahl von Amplifikationszyklen wurde der sog. *crossing point* (Cp) in der Phase der exponentiellen Zunahme des PCR-Produkts bestimmt. Der Cp bezeichnet den Reaktionszyklus, in dem der Anstieg des Fluoreszenzsignals im Vergleich zum Hintergrundsignal erstmals messbar wird. Durch Erstellung einer Standardkurve anhand einer Verdünnungsreihe einer der analysierten Probe ähnlichen cDNA wurde die Effizienz unterschiedlicher PCR-Reaktionen berücksichtigt. Dabei wurden vier Standardproben mit jeweils definierter DNA-Konzentration verwendet. Mit Hilfe der Standardkurve konnten die bestimmten Cp-Werte in arbiträre Werte umgerechnet und mit unterschiedlicher Effizienz ablaufende PCR-Reaktionen miteinander verglichen werden.

Neben den zu analysierenden Genprodukten wurde jeweils auch die cDNA eines *housekeeping gene* gemessen. Dabei handelte es sich um ein in den untersuchten Geweben bzw. unter den miteinander zu vergleichenden experimentellen Bedingungen in den Zellen gleichmäßig stark exprimiertes Referenz-Gen. Die berechneten Konzentrationen der mRNA des *housekeeping gene* konnten somit zur Normalisierung der Messwerte für das betrachtete Zielgen in der jeweiligen Probe verwendet werden. Die normalisierten Werte der analysierten Proben wurden für den Vergleich der Genexpression in den betreffenden Geweben bzw. unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen herangezogen.

### **2.2.3 Arbeiten mit RNA**

#### **2.2.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen**

Gesamte zelluläre RNA wurde aus 3T3-L1 Zellen mithilfe des *RNeasy® Mini Kits* von Qiagen oder des TRIzol Reagenz von Invitrogen isoliert.

Nach Entfernung des Zellüberstands wurden die Zellen in 350 µl des Lysepuffers RLT aufgelöst. Die genomische DNA wurde durch Abzentrifugieren über eine spezielle Säule der Firma Qiagen (QIAshredder, 2 min bei > 8000 g) oder durch wiederholtes Auf- und Abziehen der Probe in einer dünnen Kanüle mechanisch geschert. Anschließend wurde die RNA nach Herstellerprotokoll über Bindung an eine Säule isoliert. Nach abschließender zweimaliger Elution der RNA von der Säule mit je 30-40 µl nukleasefreiem Wasser (Promega) wurde die Nukleinsäure bei einer Temperatur von –80°C aufbewahrt.

Für die RNA-Isolierung aus Fettgewebe wurde TRIzol Reagenz verwendet. Etwa 50 mg von in *RNAlater* Puffer gelagertem Gewebe wurden in drei Durchgängen (jeweils 30 s) mit dem Gentle MACS in 1 ml TRIzol homogenisiert. Zur Abtrennung von Gewebe-Resten und Fett wurde das Homogenisat anschließend abzentrifugiert (10 min bei 300 g). Das Scheren der genomischen DNA erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Homogenats in einer Kanüle. Im Folgenden wurde die RNA-Isolierung nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte Nukleinsäure wurde in 30-40 µl Nuklease-freien Wassers (Promega) aufgenommen und bei –80°C gelagert.

### 2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA wurde analog zu DNA-Konzentrationen über die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt.

Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz unter Verwendung des für RNA spezifischen Extinktionskoeffizienten von 40 µg/ml:

$$C_{\text{RNA}} = E_{260} \cdot \epsilon_{\text{RNA}} \cdot V$$

$C_{\text{RNA}}$ :	Konzentration an RNA in der Lösung (µg/ml)
$E_{260}$ :	Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm
$\epsilon_{\text{RNA}}$ :	Extinktionskoeffizient von RNA (40 µg/ml)
V:	Verdünnungsfaktor, hier 1

### 2.2.3.3 Reverse Transkription

Die aus Zellen bzw. Fettgewebe isolierte Gesamt-RNA wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase des Avian-Myoblastosis-Virus (AMV-RT) in einzelsträngige cDNA überführt. Dabei wurden das *Reverse Transcription System* von Promega und *Random Hexamer* Primer verwendet. Die AMV-RT ist in der Lage, RNA als Matrize zur Synthese eines Strangs komplementärer cDNA zu nutzen. Ein RT-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

---

MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	8	μl
RT-Puffer, 10 x	4	μl
dNTP-Mix, 10 mM	4	μl
Random Hexamer Primer, 0,5 μg/μl	1	μl
RNasin Ribonuklease-Inhibitor, 40 U/μl	0,5	μl
AMV-Reverse Transkriptase, 25 U/μl	0,6	μl
RNA (1 μg) in nukleasefreiem Wasser	21,9	μl

Die Reaktion fand bei 42°C (30 min) statt. Anschließend wurde die AMV-RT durch 5 min Inkubation bei 95°C deaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.3.4 Transfektion mit siRNA

Der Einsatz von siRNA ermöglicht den spezifischen *knockdown* eines Gens in einer Zelle [132]. Es handelt sich hierbei um ein doppelsträngiges RNA-Molekül (dsRNA), mit dem die Ziel-Zellen transfiziert werden. Die Sequenz der siRNA ist zu einem kurzen Abschnitt der mRNA des auszuschaltenden Gens homolog. Der auf die Transfektion folgende intrazelluläre Prozess wird durch das Protein *dicer* vermittelt: die dsRNA wird zunächst in kürzere Oligonukleotide von 19-22 bp Länge gespalten, daraufhin wird nach Degradation des *sense*-Strangs der *antisense*-Strang in den *RNA induced silencing complex* (RISC) integriert. Über diese RNA-Fragmente kann der Komplex an die komplementären Abschnitte in der mRNA des Zielgens binden, die in der Folge gespalten und abgebaut wird. Auf diese Weise kann die Expression eines ausgewählten Gens spezifisch und ohne Einfluss auf die Regulation anderer Gene inhibiert werden (*knockdown*).

In 3T3-L1 Zellen wurde siRNA-vermittelter *knockdown* unter Verwendung des *X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent* (Roche) durchgeführt. Ein Transfektionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

siRNA (100 nM)	5	μl
X-treme	2,5	μl
DMEM/Ham's F-12 Medium, serumfrei	42,5	μl

Das Kulturmedium wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und siRNA und Transfektionsreagenz wurden anschließend in dieser Reihenfolge zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf die zu behandelnden Zellen (in 450 μl frischem Medium) getropft. Die Transfektion von 3T3-L1 Zellen erfolgte stets am Tag 0 der Differenzierung. Die weitere Differenzierung und Stimulation wurde durchgeführt wie unter 2.2.1.2 beschrieben.

## **2.2.4 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.2.4.1 Präparation von Proteinextrakten**

Zur Extrahierung von Gesamtprotein wurden Zellen nach Abnahme des Zellüberstands mit eiskaltem PBS (mit gelöstem Proteaseinhibitor) bedeckt und mit Hilfe eines Schabers vom Boden der Zellkulturflasche bzw. -schale abgelöst. Das nach 5 min Zentrifugation (4000 rpm) erhaltene Zellpellet wurde in 50 µl eiskaltem RIPA-Zelllysepuffer (mit Protease- und Phosphataseinhibitor) resuspendiert. Anschließend wurden die weiterhin eisgekühlten Lysate durch Ultraschall geschert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### **2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Proteinkonzentrationen wurden mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode [133] gemessen. Dazu wurden jeweils 10 µl einer gegebenenfalls verdünnten Probe mit 200 µl einer Mischung von 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung und Bicinchoninsäure (Mischverhältnis 1:50) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch die von den Proteinen katalysierte Reduktion der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen und deren Reaktion mit Bicinchoninsäure kommt es zur Ausbildung violett erscheinender Farbkomplexe. Durch Messung der Extinktion bei 562 nm konnte die zur Rate der Komplexbildung proportionale Proteinmenge über eine mit BSA-Proben erstellte Standardkurve berechnet werden.

### **2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine können auf SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proben wurden zunächst zur Denaturierung der Proteine sowie zur Spaltung bestehender Disulfidbrücken in einem Ladepuffer mit SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol [122] aufgekocht (5 min bei 95°C). Durch Anlagerung der negativ geladenen SDS-Moleküle an die Proteine wurde deren Eigenladung überdeckt und sie erhielten eine zu ihrer Masse proportionale negative Ladung, sodass ihr Wanderungsverhalten im elektrischen Feld ausschließlich in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht stand.

Es wurden 4,5%ige Sammelgele und, je nach optimaler Porengröße, 10% bzw. 12,5%ige Trenngele verwendet. Zugewetztes APS und TEMED induzierten die radikalische Polymerisation von Acrylamid. Die erstarrten Gele wurden in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und mit SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Die wie oben beschrieben aufgekochten Proben wurden in die durch einen Kamm im Sammelgel ausgesparten Geltaschen gefüllt.

Nach Anlegen eines Stromflusses (30 mA pro an die Apparatur angeschlossenes PA-Gel) wurden die Proteine in diesem relativ weitmaschigen oberen Gel zunächst aufkonzentriert und nach Eintritt in das sich darunter anschließende Trenngel mit kleinerem Porendurchmesser nach ihrer Größe aufgetrennt (ca. 60 min). Als Proteinstandard zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetragenen Proteine diente der peqGOLD Protein-Marker VI.

#### 2.2.4.4 Silberfärbung

Für einen sehr sensitiven Nachweis von Proteinen in Acrylamidgelen wurden diese einer Silberfärbung unterzogen. Proteine und Silberionen bilden dabei Komplexe, die nach Reduktion der  $\text{Ag}^{2+}$ -Ionen mit Formaldehyd zu elementarem Ag sichtbar werden, indem Silber als bräunliches Präzipitat ausfällt. Die nachfolgend beschriebenen Schritte der Silberfärbung folgten dem Protokoll von Heukeshoven und Dernick.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel 30 min lang in der Fixierlösung und für weitere 30 min in der Inkubationslösung inkubiert. Im Anschluss an dreimaliges Waschen in  $\text{H}_2\text{O}$  (je 5 min) wurde das Gel für 40 min in der Silberlösung unter langsamer Bewegung geschwenkt und nach einem kurzen weiteren Waschschrift mit Entwicklerlösung zur Reduktion der Silberionen inkubiert. Nach ausreichender Färbung der Proteinbanden wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA-haltiger Stopplösung beendet. Das Gel wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und konnte für eine längere Aufbewahrung mit dem *DryEase® Mini-Gel Drying System* getrocknet werden.

#### 2.2.4.5 Western Blot

Bei einem Western Blot handelt es sich um einen elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Trägermembran mit anschließendem immunologischem Nachweis.

Bei dem in dieser Arbeit angewendeten *Wet-Transfer*-Verfahren findet der Transfer in einer mit Puffer gefüllten Elektrophoresekammer statt. Die verwendeten Netze und Filterpapiere sowie das SDS-Acrylamidgel und die Membran wurden kurz vor dem Prozess in Transferpuffer äquilibriert. Die verwendete *Immun-Blot™* PVDF Membran (Bio-Rad) wurde zunächst zur Aktivierung kurz mit Methanol benetzt. Der aus den Netzen, mehreren Lagen von Filterpapieren, der Membran und dem Gel aufgebaute *Blot Sandwich* wurde in einer Kassette in die Apparatur eingespannt. Ein beigelegter Eisblock sorgte für die Kühlung des mit Hilfe eines Magnetrührers permanent gemischten Puffers während der Elektrophorese.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte innerhalb von 80 min bei einer konstanten Spannung von 90 V.

Durch eine anschließende, über einen konjugierten Antikörper vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion wurden die transferierten Proteine sichtbar gemacht. In diesem Verfahren wurde die Membran nach einstündigem Schwenken in Blockierlösung zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen und drei anschließenden Waschschritten mit PBST bzw. TBST (3x 10 min) über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert. Am Folgetag wurde die Inkubation in der Antikörper-Lösung für eine weitere Stunde unter Schwenken bei RT fortgesetzt, bevor diese abgenommen und zu späterer Wiederverwendung bei 4°C gelagert wurde. Nach Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper in drei weiteren Waschschritten wurde die Membran 1 h lang in einer Verdünnung des mit dem Enzym *horse radish peroxidase* (HRP) konjugierten sekundären Antikörpers in Blockierlösung (Mischverhältnis i. d. R. 1:5000 oder 1:10000) geschwenkt. Nach erneutem Waschen wurde die HRP-Aktivität nach Inkubation mit *ECL Plus Western-blotting Detection Reagent* (Amersham Biosciences) detektiert. Die beiden Komponenten des ECL-Systems wurden dafür gemäß Hersteller-Protokoll miteinander vermischt und die Membran mit 1 ml der Lösung für 5 min bei RT bedeckt. Die von der HRP in der ECL-Lösung katalysierte Reaktion läuft unter Energiefreisetzung in Form von Chemilumineszenz ab. Diese kann auf einem Autoradiographie-Film detektiert werden. Die Membran wurde in einer Klarsichtfolie in eine gegen Lichteinstrahlung abgedichtete Filmkassette gesteckt und ein *Hyperfilm ECL*<sup>TM</sup> je nach Intensität des Signals für wenige Sekunden bis zu maximal 60 min (i. d. R. 1-10 min) auf die Folie gelegt. Nach Entwicklung des Films wurden die auf der Membran vom verwendeten Antikörper gebundenen Proteine als dunkle Banden sichtbar.

#### 2.2.4.6 Coomassie-Färbung

Durch Anfärbung mit *Coomassie Brilliant Blue* werden Proteine unter Ausbildung eines blauen Komplexes unspezifisch nachgewiesen. In einer SDS-PAGE aufgetrennte und anschließend auf eine PVDF Membran transferierte Proteine wurden auf diese Weise sichtbar gemacht. Die Membran wurde 15 min lang in Wasser gewaschen, mit *Biosafe*<sup>TM</sup> *Coomassie* (Bio-Rad) bis zum Auftreten sichtbar angefärbter Proteinbanden inkubiert und nach dem Abwaschen von ungebundenem Farbstoff zur Aufbewahrung an der Luft getrocknet.

#### 2.2.4.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In Lösung befindliche Proteine wurden mit Hilfe eines *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) spezifisch detektiert. Es handelt sich dabei ähnlich wie bei der Methode des Western Blot um einen immunologischen Nachweis mit an die Antikörper-Bindung gekoppelter Farbreaktion. Der am Boden der Testplatte fest fixierte Antikörper (*capture antibody*) immobilisierte durch spezifische Bindung das in der aufgetragenen Probe gelöste Protein, das nach einem Waschvorgang anschließend von einem zweiten, biotinylierten Antikörper (*detection antibody*) gebunden wurde. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des Enzyms HRP, das über konjugiertes Streptavidin an das mit dem *detection antibody* verknüpfte Biotin gebunden wurde. Die auf diese Weise an dem spezifisch an das Zielprotein gebundenen Antikörper immobilisierte HRP katalysierte die durch einen Farbwechsel sichtbare Umsetzung eines zugegebenen Chromogens. Die zur Menge des gebundenen Proteins proportionale Bildung des Farbstoffes wurde photometrisch nachgewiesen. Anhand einer Standardkurve konnte aus der gemessenen Extinktion die Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe berechnet werden.

Bei der Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten humanen und murinen ELISA Kits wurde jeweils gemäß den Hersteller-Angaben zur Quantifizierung gelöster Proteine in Zellkulturüberständen und in Serumproben verfahren.

#### 2.2.4.8 Bestimmung der Zell-Vitalität

Zur Überprüfung einer möglichen zytotoxischen Wirkung applizierter Substanzen auf 3T3-L1 Zellen wurde der *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche) verwendet. Dieser beruht auf einem colorimetrischen Nachweis der Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Zellüberstand. LDH ist ein im Zytoplasma lokalisiertes Enzym, das nur im Falle von Zelltod und -lyse in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Daher besteht eine positive Korrelation zwischen messbarer LDH-Aktivität im Überstand der Zellkultur und der Anzahl abgestorbener Zellen.

Für den Test wurde der Zellüberstand mit serumfreiem Kulturmedium verdünnt (i. d. R. im Mischverhältnis 1:1 oder 1:3), anschließend wurden dem Hersteller-Protokoll entsprechend die Reaktionskomponenten  $\text{NAD}^+$ , Katalyst und der Farbstoff Tetrazolium zugegeben. Frisches Kulturmedium wurde als Negativkontrolle verwendet. Der Reaktionsansatz wurde 30 min lang bei RT im Dunkeln inkubiert, dabei katalysierte in der Probe gelöstes LDH die Umsetzung des im Überstand ebenfalls vorhandenen Lactats zu Pyruvat unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH/H}^+$ . In einer anschließenden Redox-Reaktion wurde der gelbliche Farbstoff

Tetrazolium durch Katalyst unter Oxidation von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  in den roten Farbstoff Formazan umgewandelt. Über dessen photometrische Bestimmung (Messung bei 490 nm) konnte im Vergleich zur Negativkontrolle die relative LDH-Konzentration und somit die Zell-Vitalität in der Probe ermittelt werden.

#### **2.2.4.9 Oil Red O Färbung**

Zum Nachweis der erfolgten Umwandlung von 3T3-L1 Fibroblasten zu reifen Adipozyten wurden am Tag 9 der Differenzierung die Größe und Anzahl der intrazellulären Lipidtröpfchen untersucht, die zu diesem Zweck mit Oil Red O angefärbt wurden. Nach Entfernung des Überstands und Waschen der Zellen in PBS erfolgte eine Fixierung in 10%igem Formaldehyd (5 min bei RT). Anschließend wurden die Zellen in 60%igem Isopropanol gewaschen und nach kurzem Trocknen an der Luft für 20 min mit der Oil Red O Färbelösung bedeckt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die 3T3-L1 mehrmals mit Wasser gewaschen und die nun leuchtend rot gefärbten Lipidtröpfchen unter dem Mikroskop analysiert.

### **2.2.5 Rekombinante Proteinexpression in eukaryotischen Zellen**

#### **2.2.5.1 Expression rekombinanter Proteine im Bakulovirus Expressionssystem**

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete eukaryotische Expressionssystem zur heterologen Proteinexpression beruht auf der Infektion von Insektenzellen, im vorliegenden Fall Sf21 und H5 Zellen, mit rekombinanten Bakuloviren.

Bei den *Baculoviridae* handelt es sich um eine Gruppe von DNA-Viren, deren vorrangige Wirtsorganismen Insekten sind. Als Expressionssystem wird vor allem das *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) verwendet.

Das im AcNPV-Genom vorhandene Polyhedrin-Gen ist nicht essentiell für die Vermehrung des Virus in der Wirtszellkultur, daher dient dieser Genlocus zur Insertion des das Zielgen enthaltenden DNA-Konstrukts. Der vorgeschaltete, sehr aktive Polyhedrin-Promotor begünstigt dabei eine hohe Transkriptionsrate der Fremd-DNA und somit eine relativ starke Expression des rekombinanten Proteins (bis zu 30% der Gesamtproduktion an Protein).

Proteine mit entsprechenden Signalpeptiden werden in den Zellüberstand sezerniert und sind dort leicht zugänglich für eine Aufreinigung. Ein Vorteil der Expression von CTRP-3 in Insektenzellen im Vergleich zu prokaryotischen Expressionssystemen liegt in der Fähigkeit



zur Ausbildung posttranslationaler Modifikationen, die von großer Bedeutung für die Funktionalität und Stabilität insbesondere sekretorischer Proteine sein können.

### 2.2.5.2 Generierung rekombinanter Bakuloviren

Zur Herstellung rekombinanter Bakuloviren wurde in dieser Arbeit das *BacPak<sup>TM</sup> Baculovirus Expression System* (BD Biosciences) verwendet. Sf21 Zellen wurden mit viraler DNA (BacPAK6) und mit dem Expressionsvektor pLP-BacPak9 kotransfiziert, dessen Insertionsstelle für CTRP-3 bzw. gCTRP-3 codierende DNA enthielt. Durch die Verwendung von BacPAK6 wurden rekombinante Viren selektiert, da dieser viralen DNA aufgrund einer Deletion der für ihre Replikation essentielle ORF 1629 fehlt. Infolgedessen konnten sich ausschließlich solche Viren, die den ORF 1629 und den benachbarten Polyhedrin-Promotor durch homologe Rekombination mit dem Expressionsvektor in ihr Genom aufgenommen hatten, in den Insektenzellen vermehren.

Ein Ansatz zur Kotransfektion setzte sich wie folgt zusammen:

BacPAK6 virale DNA, 20 ng/μl	5	μl
pLP-BacPak9 mit cDNA-Insert, 160 ng/μl	3,2	μl
Bacfectin	4	μl
ddH <sub>2</sub> O, steril	89,7	μl

Nach 15minütiger Inkubation des Ansatzes bei RT wurde dieser tröpfchenweise auf  $1 \times 10^6$  Sf21 Zellen in einer Zellkulturschale gegeben und unter leichtem Schwenken im Kulturmedium (1,5 ml serumfreies SF900-Medium) verteilt. Die transfizierten Zellen wurden 5 h lang bei 27°C inkubiert und nach anschließender Zugabe von 1,5 ml BacPAK *Complete Medium* für 3 Tage weiterhin bei 27°C kultiviert. Eine erfolgreiche Transfektion war nach dieser Inkubationszeit an charakteristischen Veränderungen im Phänotyp der Insektenzellen zu erkennen, v. a. an vergrößertem Zellvolumen, einem granulären Erscheinungsbild mit dunklen Einschlüssen und an verringerter Haftung am Boden der Zellkulturflasche. Der die rekombinanten Viren enthaltende Überstand wurde abgenommen und nach Zentrifugation (300 g, 5 min) bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Er diente später für die Infektion von H5 Zellen.

Die kotransfizierten Sf21 Zellen wurden geerntet und ihre in RIPA-Puffer gelösten Proteinlysate zusammen mit Proben des Zellüberstands zur Überprüfung der Expression bzw. Sekretion des rekombinanten Zielproteins in SDS-PAGE und Western Blot verwendet.

### 2.2.5.3 Infektion von H5 Zellen

In Kulturflaschen für semi-adhärenente Zellen mit serumfreiem *Express Five<sup>TM</sup> Medium* bei 27°C kultivierte H5 Insektenzellen (ausgesäte Zelldichte:  $2,5 \times 10^7$  auf 75 cm<sup>2</sup>, in 10 ml Medium) wurden mit 100-1000 µl eines rekombinante Bakuloviren enthaltenden Zellüberstandes infiziert, wobei das zugegebene Volumen jeweils abhängig von der in vorherigen Infektionsansätzen beobachteten Effizienz der verwendeten Viren-Suspension war. Nach 4 Tage lang fortgesetzter Kultivierung der Zellen bei 27°C wurde der Zellüberstand geerntet und zentrifugiert (300 g, 5 min), anschließend wurde er entweder lichtgeschützt bei 4°C für weitere Infektionen aufbewahrt oder zur Aufreinigung des von den H5 Zellen sezernierten Zielproteins verwendet. In letzterem Fall wurde dem Überstand *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail* (EDTA-frei; Roche) zur Inaktivierung von Proteasen zugesetzt und die Probe bis zur Aufreinigung bei -80°C gelagert. Die H5 Zellen wurden in RIPA-Puffer aufgelöst und in den Lysaten die Expression des Zielproteins via SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

### 2.2.5.4 Transfektion von HEK293T/17 Zellen

Der Transfer des Expressionsvektors pIRESneo mit dem Genkonstrukt sig\_gctrp-3 in HEK293T/17 Zellen wurde mit Hilfe des *Lipofectamine<sup>®</sup>2000 DNA Reagent* (Invitrogen) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. 15 µl des *Lipofectamine<sup>®</sup>2000* Reagenz wurden in 600 µl und 14 µg Expressionsvektor in 700 µl *Opti-MEM<sup>®</sup> Medium* verdünnt und die Lösungen nach Vereinigung 5 min bei RT zur Ausbildung von DNA-Lipid-Komplexen inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf  $1 \times 10^6$  Zellen in einer Zellkultur-Petrischale gegeben und diese wieder unter den üblichen Kultivierungsbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, hohe Luftfeuchtigkeit; 2.2.1.3) inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurde nach einem Mediumwechsel G418 zugegeben (2 mg/ml). Da der Expressionsvektor pIRESneo ein gegen dieses Antibiotikum wirksames Resistenzgen trägt, erfolgte dadurch eine Selektion erfolgreich transformierter HEK293T/17. G418 wurde bei jedem Mediumwechsel frisch zugegeben und die überlebenden Zellen nach 2-3 Wochen aus der Petrischale in eine Kulturflasche für adhärenente Zellen überführt und dort weiter kultiviert. Beim Passagieren der Zellen wurden die alten Überstände gesammelt und bis zur Aufreinigung bei -80°C aufbewahrt. Aus einem Teil der Zellen wurde DNA oder Gesamtprotein isoliert und zur Überprüfung des Transfektions- und Expressionserfolges via PCR bzw. SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

### 2.2.5.5 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Vermittelt durch das in seiner Aminosäuresequenz enthaltene Signalpeptid wurde exprimiertes CTRP-3 aus H5 Zellen in das Kulturmedium sezerniert, aus dem es mit Hilfe des am C-Terminus angefügten 6xHN-Tags unter Verwendung des *BD TALON<sup>TM</sup> Purification Kits* (BD Biosciences) aufgereinigt wurde.

Die anhand einer Affinitätssäule durchgeführte Proteinreinigung erfolgte nach dem Prinzip der *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC). Sie beruht auf der reversiblen Bindung der Histidin-Seitenketten des 6xHN-Tags an die in der Matrix des verwendeten *TALON<sup>TM</sup> Metal Affinity Resins* immobilisierten  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen. Im Überschuss zugegebenes Imidazol verdrängt als kompetitiver Konkurrent die Histidin-Seitenketten von den Bindungsstellen der  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen, wodurch das Protein von der Säulenmatrix eluiert wird.

Die geernteten Zellüberstände wurden über Nacht bei 4°C einer Dialyse gegen – zwischenzeitlich einmal ausgewechseltes – PBS unterzogen, um die Salzkonzentration im Medium zu reduzieren. Das Dialysat wurde zur Abtrennung potentiell gebildeter Präzipitate filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm). Anschließend wurde zuvor mit Äquilibrationpuffer (*BD TALON<sup>TM</sup> Buffer Kit*) gewaschenes Resin zu dem Filtrat gegeben (Mischverhältnis 1:100). Dieser Ansatz wurde zur Extraktion des Proteins aus der Lösung 3 h lang bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde das Resin aus dem Filtrat abzentrifugiert (700 g, 5 min), in 900 µl Äquilibrationpuffer mit 0,5% (v/v) Tween<sup>®</sup>20 zunächst gewaschen, danach im gleichen Volumen resuspendiert und auf eine Säule (*Handee<sup>TM</sup> Mini-Spin Column*) geladen. Die auf diese Weise hergestellte Affinitätssäule wurde zur Entfernung von unspezifisch an das Resin gebundenen Proteinen mit 6 ml des mit 0,5% Tween<sup>®</sup>20 und 1 mM Imidazol versetzten Äquilibrationpuffers und anschließend mit 1 ml Äquilibrationpuffer mit 0,5% Tween<sup>®</sup>20 gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des gebundenen Zielproteins von der Säulenmatrix i. d. R. in vier Fraktionen durch Zugabe von jeweils 210 µl Elutionspuffer (150 mM Imidazol, *BD TALON<sup>TM</sup> Buffer Kit*).

Von den Fraktionen des Eluats wurden jeweils 10 µl in einer SDS-PAGE aufgetrennt und der Erfolg der Proteinreinigung durch eine Silberfärbung überprüft. Fraktionen mit hinreichender Menge und Reinheitsgrad des Zielproteins wurden vereinigt und zur Entfernung von Imidazol bei 4°C zweimal für je 1 h gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend sterilfiltriert, in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert. Eluat-Fractionen mit großer Menge an Zielprotein, aber zu hoher Verunreinigung, wurden gegen PBS dialysiert und anschließend ein weiteres Mal dem Prozess der Proteinreinigung unterzogen.

### 2.2.6 Tierexperimente

Für das murine Entzündungsmodell (SIRS) wurden Wildtyp-Mäuse des Zuchtstamms C57BL/6N der Firma Charles River (Sulzfeld) verwendet. Zur Induktion eines inflammatorischen Zustandes wurde den Tieren jeweils 1 µg LPS (gelöst in H<sub>2</sub>O) oder – als Kontrolle – das entsprechende Volumen an H<sub>2</sub>O intraperitoneal (ip) injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub> (mit anschließender zervikaler Dislokation) getötet. Blut wurde durch Punktion des Herzens entnommen, außerdem wurden epididymales, subkutanes und viszerale Fettgewebe explantiert. In dem gewonnenen Blutserum wurden die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und MIP-2 gemessen. Aus den Fettgewebe-Proben wurde mRNA isoliert und die lokale Genexpression der genannten Faktoren durch *Real-time* RT-PCR bestimmt. Um einen anti-inflammatorischen Einfluss von CTRP-3 auf das SIRS zu überprüfen, wurden den Tieren 30 min vor LPS-Gabe jeweils 10 µg rekombinantes CTRP-3 (in PBS gelöst) ip oder in die Schwanzvene (intravenös, iv) injiziert. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Hanses (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) entsprechend den geltenden ethischen Richtlinien des Universitätsklinikums Regensburg und mit Genehmigung der örtlichen Tierethikkommission durchgeführt.

### 2.2.7 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Datensätze erfolgte in SPSS 18, 19 und 21 mit Hilfe von Mann-Whitney-U-Test, einfaktorieller ANOVA, partieller Korrelationsanalyse und bivariater Korrelation nach Spearman. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 betrachtet und präzise angegeben.

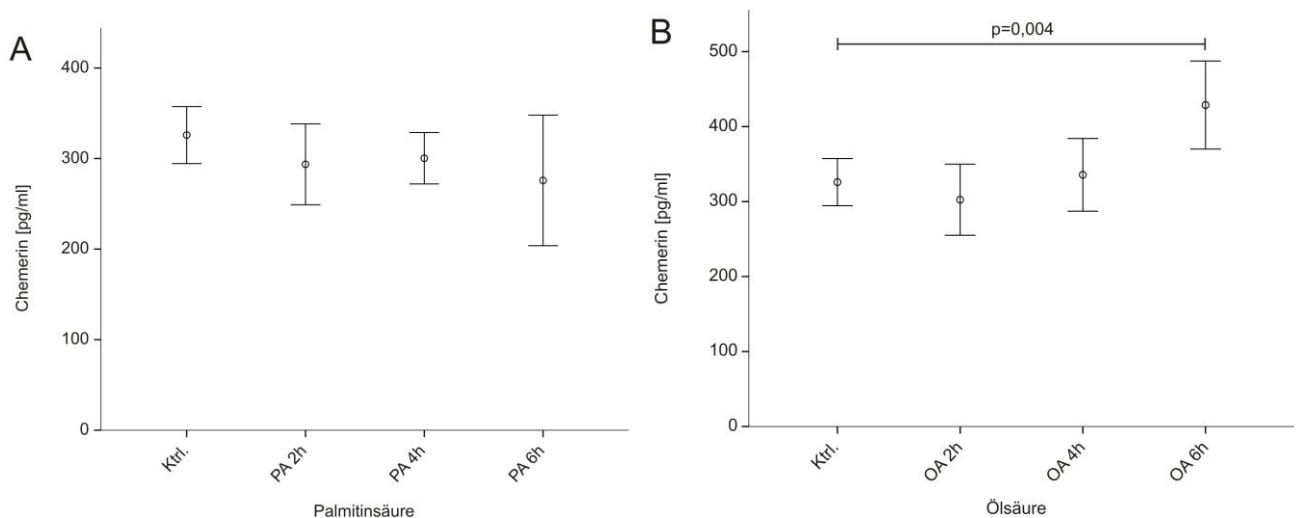
Die gezeigten Diagramme wurden in SPSS 18, 19 und 21 erstellt. In den Balkendiagrammen sind die berechneten Mittelwerte als Kreise abgebildet, die Whisker bezeichnen jeweils den doppelten *standard error of the mean* (SEM, Standardfehler des Mittelwertes). Bei der Darstellung als Boxplot entspricht die Box mit dem eingezeichneten Median den beiden mittleren Quartilen. Die Whisker repräsentieren hier die weiteren jeweils nach oben und unten in einem maximalen Abstand der 1,5fachen Breite der mittleren Quartile befindlichen Werte. Außerhalb dieser Intervalle gelegene Ausreißer sind durch Kreise dargestellt.

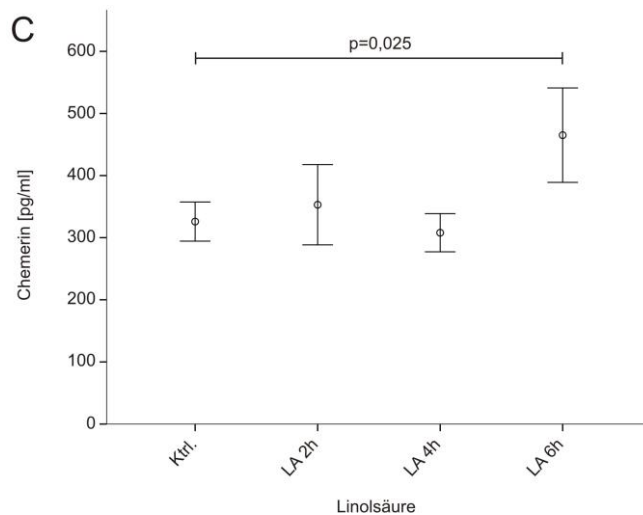
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Adipozytäre und zirkulierende Konzentrationen von Chemerin, IL-8 und CCL2 bei Hyperlipidämie

##### 3.1.1 Einfluss von freien Fettsäuren auf Chemerin, IL-8 und CCL2 im Überstand von 3T3-L1 Adipozyten

Um die Auswirkungen einer Stimulation mit freien Fettsäuren auf inflammatorische Adipokine und Zytokine in den Überständen von Adipozyten zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente in den aus 3T3-L1 Fibroblasten differenzierten Adipozyten durchgeführt. Die Zellen wurden mit serumfreiem, den jeweiligen Stimulus enthaltendem Medium bedeckt. In getrennten Ansätzen wurden Adipozyten mit Ölsäure (OA; Konzentration im Zellüberstand: 20  $\mu$ M), Linolsäure (LA; Konzentration im Zellüberstand: 20  $\mu$ M) und Palmitinsäure (PA; Konzentration im Zellüberstand: 200  $\mu$ M) für die Dauer von 2, 4 und 6 h inkubiert. Die eingesetzten Mengen an Fettsäuren entsprachen den in Vorversuchen als für die Zell-Vitalität unschädlich festgestellten Mengen (vgl. 2.2.4.8). In den nach der Inkubation abgenommenen Überständen wurden via ELISA die Konzentrationen von Chemerin, IL-8 und CCL2 bestimmt. Die Menge an Chemerin im Zellüberstand wurde durch Stimulation mit Ölsäure ( $p = 0,004$ ; Abb. 3 B) und mit Linolsäure ( $p = 0,025$ ; Abb. 3 C) jeweils signifikant erhöht. Palmitinsäure zeigte hingegen keinen vergleichbaren Effekt (Abb. 3 A).

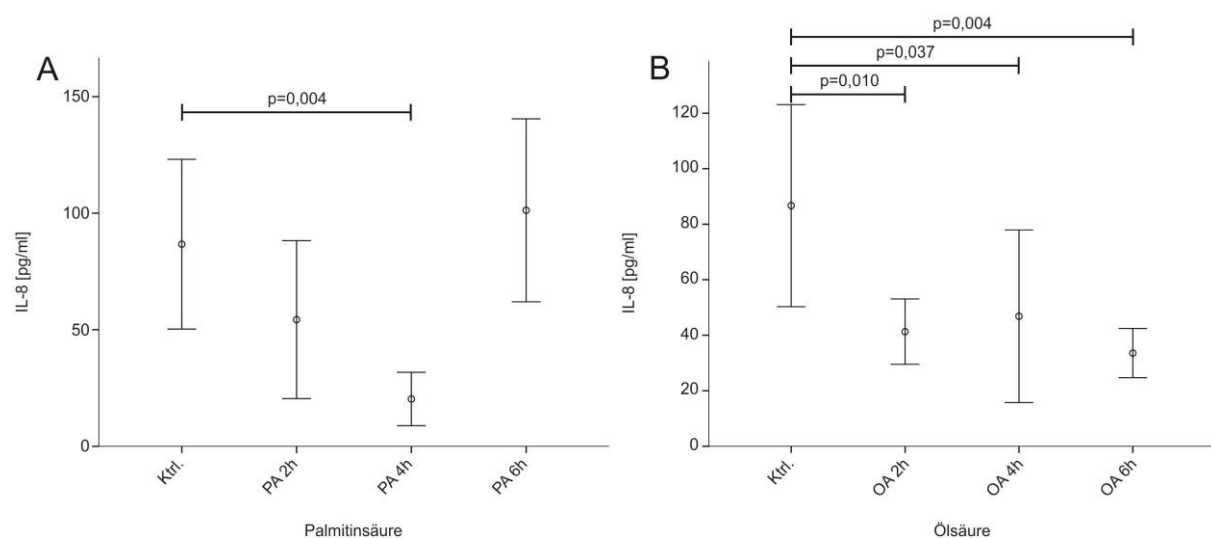


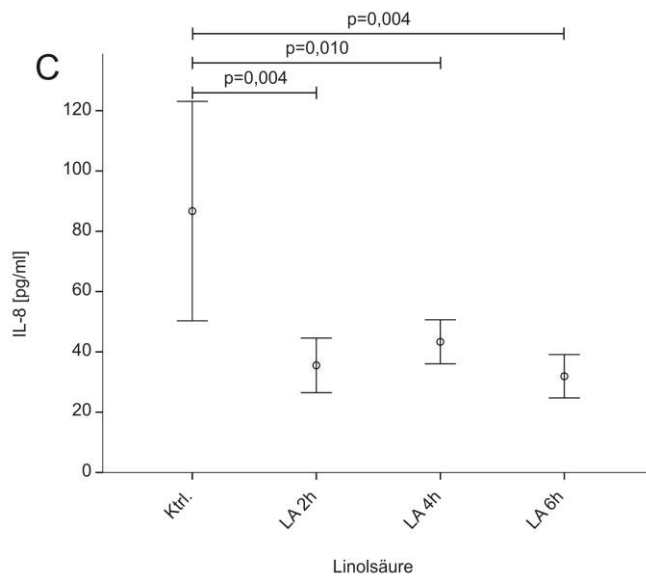


**Abb. 3:** Konzentration von Chemerin in den Zellüberständen von 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit Palmitinsäure (PA; A), Ölsäure (OA; B) und Linolsäure (LA; C) über eine Dauer von 2, 4 und 6 h. Ktrl. = mit BSA/EtOH behandelte Kontrolle; n = 6 in allen Ansätzen

Die Konzentration von IL-8 war in den mit Ölsäure und Linolsäure (Abb. 4 B und C) behandelten Ansätzen signifikant verringert, mit dem stärksten Rückgang nach 6 h. Die Inkubation mit Palmitinsäure bewirkte einen Rückgang von IL-8 nach 4 h, weitere 2 h später hatten sich die Werte wieder normalisiert (Abb. 4 A).

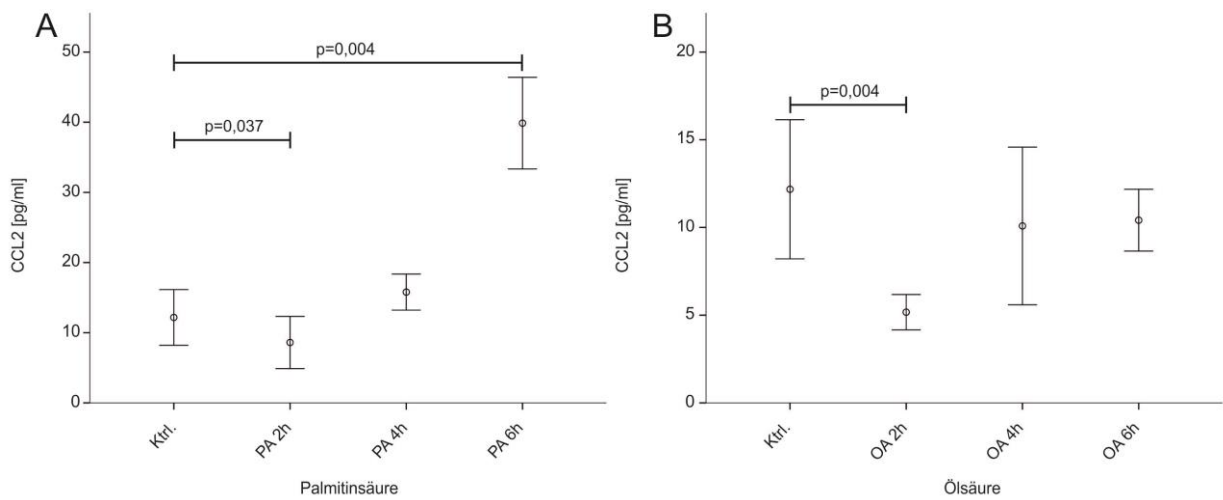
Die Menge an CCL2 war in den mit Ölsäure und Linolsäure (Abb. 5 B und C) behandelten Ansätzen nach 2 h signifikant verringert und stieg danach jeweils wieder an. Bei Inkubation mit Palmitinsäure kam es zu einer deutlichen Zunahme von CCL2 nach 6 h (Abb. 5 A).

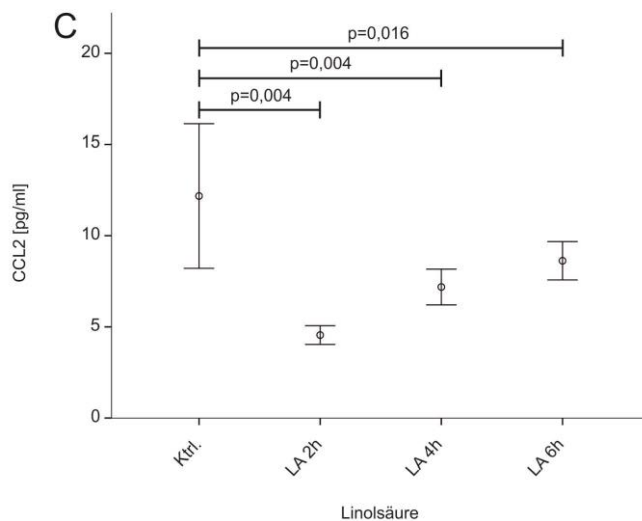




**Abb. 4:** Konzentration von IL-8 im Zellüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit Palmitinsäure (PA; A), Ölsäure (OA; B) und Linolsäure (LA; C) über 2, 4 und 6 h.

Ktrl. = mit BSA/EtOH behandelte Kontrolle; n = 6 in allen Ansätzen





**Abb. 5:** Konzentration von CCL2 im Zellüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit Palmitinsäure (PA; A), Ölsäure (OA; B) und Linolsäure (LA; C) über 2, 4 und 6 h.

Ktrl. = mit BSA/EtOH behandelte Kontrolle; n = 6 in allen Ansätzen

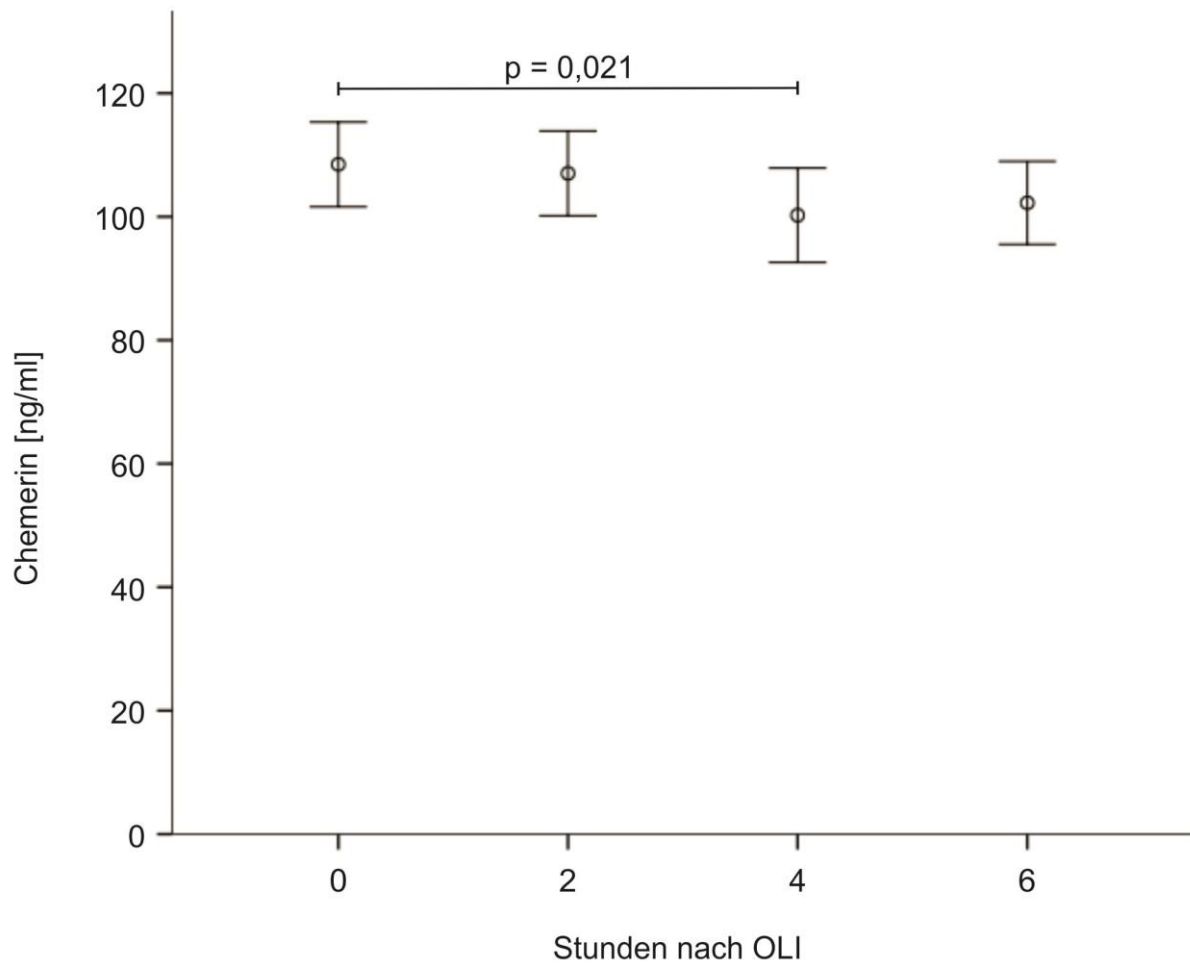
### 3.1.2 Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches Chemerin

Nach Aufnahme der Fettemulsion stieg der Spiegel der zirkulierenden Triglyzeride rasch und stark an (von  $120 \pm 50$  mg/dl auf  $173 \pm 70$  mg/dl;  $p < 0,001$  nach 2 h) und blieb im gesamten beobachteten Zeitraum signifikant erhöht [125]. Die Konzentrationen von CRP, Gesamtcholesterin sowie HDL- und LDL-Cholesterin blieben hingegen weitgehend unverändert. Die Auswirkungen der experimentell herbeigeführten kurzfristigen Hyperlipidämie auf die immunmodulatorischen sekretorischen Proteine Chemerin, IL-8, CCL2 und CTRP-3 wurden anhand der zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach Beginn der Studie entnommenen Serumproben untersucht.

#### 3.1.2.1 Serumkonzentrationen vor und nach oraler Fettaufnahme

Die Serumspiegel von Chemerin wurden für alle 100 Probanden der Fettbelastungsstudie bestimmt. Dabei lagen die basalen Messwerte vor der Fettaufnahme im Bereich von 46,4 bis 241,7 ng/ml, bei einem Mittelwert von 108,5 ng/ml sowie einer Standardabweichung von 34,3 ng/ml. Nach Aufnahme der Fettemulsion gingen die Chemerinspiegel leicht zurück, auf durchschnittlich  $100,2 \pm 38,2$  ng/ml ( $t = 4$  h;  $p = 0,021$ ; Abb. 6).

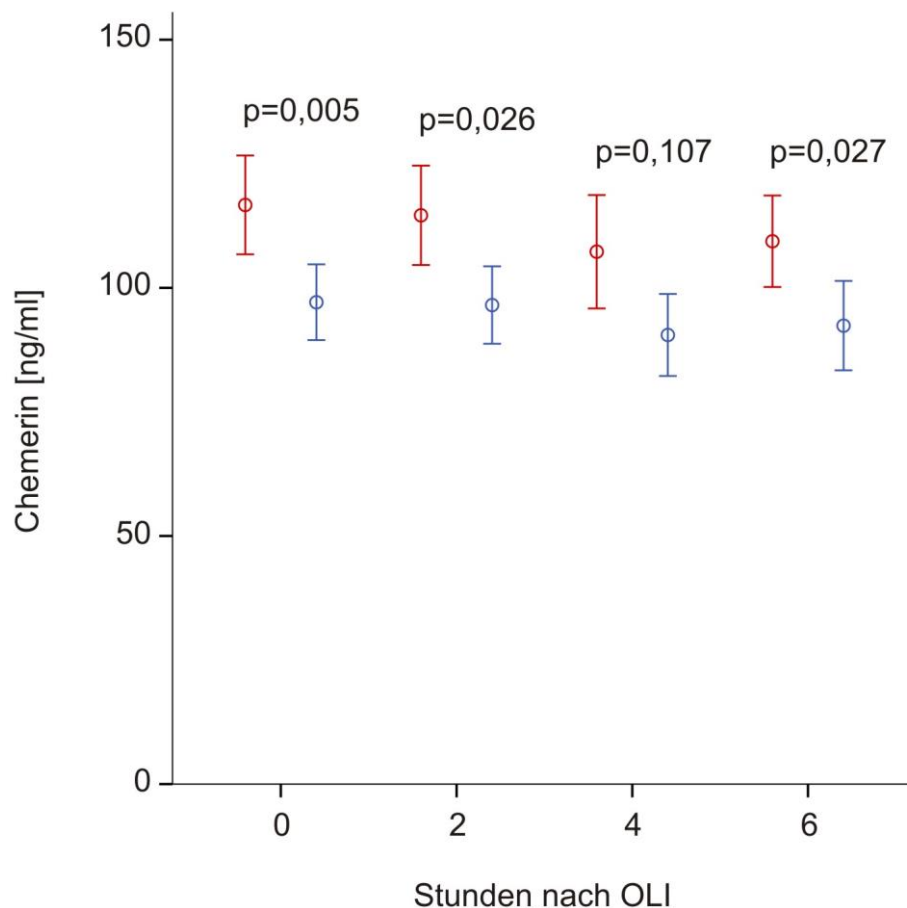




**Abb. 6:** Zeitlicher Verlauf der Serumkonzentration von Chemerin nach OLI. Die Blutproben für die Messungen ( $n = 100$ ) wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach der Fettaufnahme entnommen.

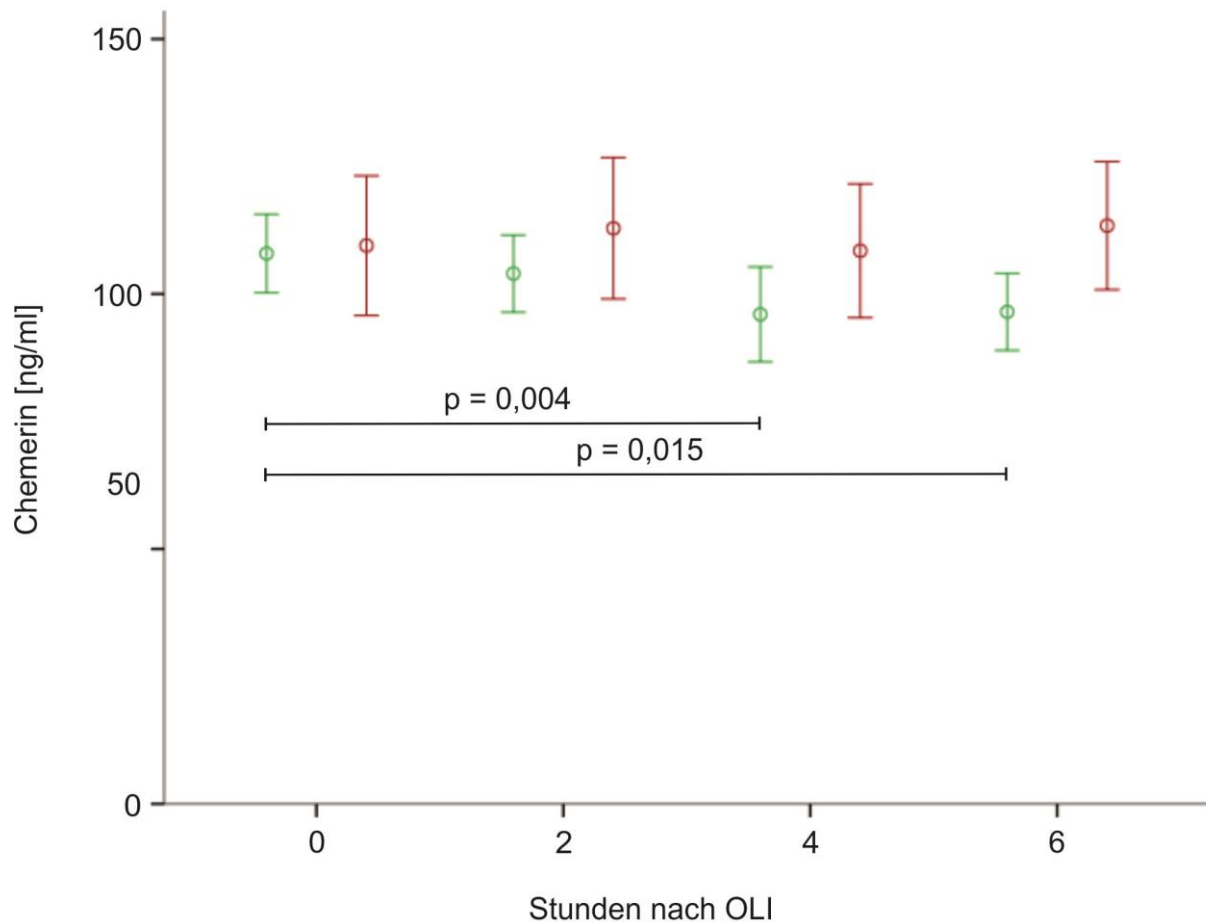
### 3.1.2.2 Einfluss von Geschlecht und BMI

Bei differenzierter Analyse des Gesamtkollektivs wurden hinsichtlich der Chemerinkonzentrationen sowohl im nüchternen Zustand als auch nach oraler Fettaufnahme deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt. In den Seren der weiblichen Studienteilnehmer ( $n = 58$ ) wurde ein basaler Mittelwert von  $116,7 \pm 37,9$  ng/ml gemessen, gegenüber basal  $97,1 \pm 24,7$  ng/ml bei den männlichen Probanden ( $n = 42$ ). Diese Differenz zwischen den Geschlechtern war statistisch signifikant ( $p = 0,005$ ) und bestand auch zu den Zeitpunkten 2 und 6 h nach der Fettaufnahme (Abb. 7).



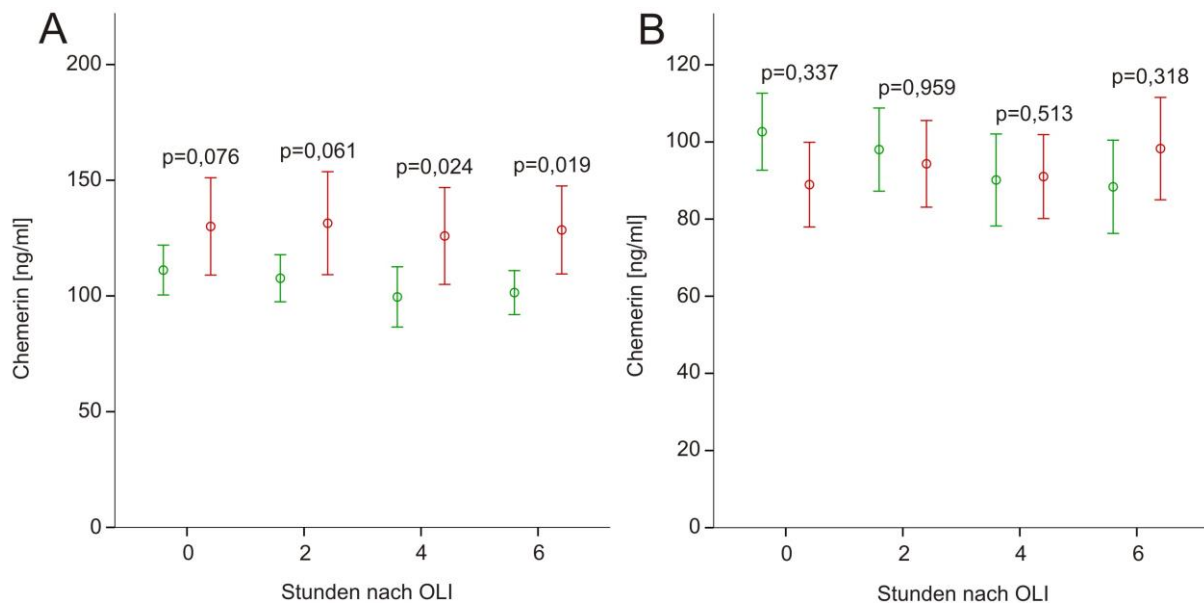
**Abb. 7:** Zeitlicher Verlauf der Chemerinkonzentrationen im Serum weiblicher (n = 58; rote Balken) und männlicher Probanden (n = 42; blaue Balken) nach OLI. Die Blutproben für die Messungen wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach der Fettaufnahme entnommen. Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu den entsprechenden Zeitpunkten.

Neben diesem Geschlechtsdimorphismus traten auch BMI-abhängige Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Chemerinkonzentrationen nach Fettaufnahme auf. In der Subgruppe der normalgewichtigen Probanden (n = 66; BMI < 25) fand nach 4 h ein leichter Rückgang des Chemerinspiegels statt (p = 0,004), bei den übergewichtigen Testpersonen (n = 34; BMI ≥ 25) zeigte sich hingegen keine entsprechende Veränderung unter Fettbelastung (Abb. 8).



**Abb. 8:** Zeitlicher Verlauf der Chemerinkonzentrationen im Serum normalgewichtiger (BMI < 25; n = 66; grüne Balken) und übergewichtiger Probanden (BMI ≥ 25; n = 34; rote Balken) nach OLI. Die Blutproben für die Messungen wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach Fettaufnahme entnommen.

Bei einer Aufteilung des Kollektivs nach BMI und Geschlecht wurden in der weiblichen Subgruppe nach Fettaufnahme erhöhte Chemerinkonzentrationen von übergewichtigen gegenüber normalgewichtigen Probandinnen festgestellt (t = 4 h:  $125,9 \pm 43,2$  ng/ml gegen  $99,6 \pm 41,8$  ng/ml,  $p = 0,024$ ; Abb. 9 A). Bei den männlichen Teilnehmern der Studie wurden hingegen keine signifikanten BMI-abhängigen Unterschiede beobachtet (Abb. 9 B).



**Abb. 9:** Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Chemerin im Serum weiblicher (Abb. 9 A; normalgewichtig:  $n = 41$ , grüne Balken; übergewichtig:  $n = 17$ , rote Balken) und männlicher Probanden (Abb. 9 B; normalgewichtig:  $n = 25$ , grüne Balken; übergewichtig:  $n = 17$ , rote Balken) nach OLI. Die Blutproben für die Messungen wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach der Fettaufnahme entnommen. Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede zwischen den BMI-Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten.

### 3.1.2.3 Bivariate Korrelationen

Beim Vergleich der gemessenen basalen Chemerinkonzentrationen mit anthropometrischen und physiologischen Parametern durch eine bivariate Korrelationsanalyse nach Spearman (Tab. 1) wurden statistisch signifikante positive Korrelationen mit CRP ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,002$ ), C-Peptid ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,017$ ), Insulin ( $r = 0,24$ ;  $p = 0,018$ ), dem Triglyzeridspiegel ( $r = 0,21$ ;  $p = 0,038$ ), Gesamt- ( $r = 0,33$ ;  $p = 0,001$ ) und LDL-Cholesterin ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,012$ ), Leptin ( $r = 0,41$ ;  $p < 0,001$ ) sowie mit dem Verhältnis von Leptin zu Adiponektin (L/A-Quotient;  $r = 0,36$ ;  $p < 0,001$ ) gefunden. Im Anschluss an die orale Fettaufnahme wurden diese Korrelationen weiterhin beobachtet.

Die Chemerinkonzentration war nicht signifikant mit dem BMI der Probanden korreliert. Allerdings erwiesen sich bei einer partiellen, um Einflüsse des BMI korrigierten Korrelationsanalyse im basalen Zustand lediglich die Korrelationen mit CRP ( $r = 0,38$ ;  $p < 0,001$ ), Gesamtcholesterin ( $r = 0,26$ ;  $p = 0,009$ ) und Leptin ( $r = 0,28$ ;  $p = 0,005$ ) als statistisch signifikant.

		t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 6 h
Chemerin n = 100	Triglyzeride	r = 0,21 p = 0,038	r = 0,23 p = 0,024	n. s.	r = 0,28 p = 0,005
	CRP	r = 0,31 p = 0,002	r = 0,32 p = 0,001	r = 0,33 p = 0,001	r = 0,39 p < 0,001
	Cholesterin	r = 0,33 p = 0,001	r = 0,30 p = 0,003	r = 0,30 p = 0,003	r = 0,34 p = 0,001
	LDL- Cholesterin	r = 0,25 p = 0,012	r = 0,23 p = 0,019	n. s.	r = 0,31 p = 0,002
	C-Peptid	r = 0,24 p = 0,017	r = 0,27 p = 0,007	n. s.	r = 0,27 p = 0,007
	Insulin	r = 0,24 p = 0,018	r = 0,23 p = 0,023	n. s.	r = 0,27 p = 0,007
	Leptin	r = 0,41 p < 0,001	r = 0,43 p < 0,001	r = 0,43 p < 0,001	r = 0,37 p < 0,001

**Tab. 1:** Bivariate Korrelationen von Chemerin mit ausgewählten Serumparametern zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach Beginn der Fettbelastung (Korrelationen nicht korrigiert um Einflüsse des BMI).

Die Chemerinkonzentrationen wurden des Weiteren auf Korrelationen mit den Adipokinen Resistin, Visfatin und Lipocalin-2 geprüft, mit diesen Parametern bestanden keine signifikanten Zusammenhänge.

Nach Unterteilung des Gesamtkollektivs nach dem Geschlecht zeigten sich im basalen Zustand ausschließlich in der Gruppe der weiblichen Probanden (n = 58) positive Korrelationen der Chemerinkonzentration mit dem BMI sowie mit C-Peptid, Insulin, CRP, Gesamt- und LDL-Cholesterin, Triglyzeridspiegel, Leptin und dem L/A-Quotienten. Unter Fettbelastung blieben die Korrelationen mit diesen Parametern, mit Ausnahme von Gesamt- und LDL-Cholesterin, durchgehend bestehen. Die Korrelationen von Chemerin mit CRP (r = 0,37; p = 0,005) und Gesamtcholesterin (r = 0,28; p = 0,034) waren auch nach einer Korrektur um Einflüsse des BMI statistisch signifikant.

In der Gruppe der männlichen Probanden (n = 42) wurde hingegen kein Zusammenhang zwischen basalem Chemerin und dem BMI oder anderen untersuchten Parametern beobachtet.

Nach oraler Fettaufnahme lagen signifikante Korrelationen mit den Konzentrationen von Gesamtcholesterin ( $t = 2$  h;  $r = 0,38$ ;  $p = 0,014$ ) und LDL-Cholesterin ( $t = 2$  h:  $r = 0,37$ ;  $p = 0,015$ ) vor.

Für eine weitere differenzierte Analyse des Studienkollektivs wurde eine Einteilung in normalgewichtige ( $BMI < 25$ ;  $n = 66$ ) und übergewichtige Probanden ( $BMI \geq 25$ ;  $n = 34$ ) vorgenommen. In der Gruppe der Normalgewichtigen bestanden im basalen Zustand positive Korrelationen von Chemerin mit Gesamtcholesterin ( $r = 0,40$ ;  $p = 0,001$ ), LDL-Cholesterin ( $r = 0,36$ ;  $p = 0,003$ ), Leptin ( $r = 0,36$ ;  $p = 0,003$ ) und mit dem L/A-Quotienten ( $r = 0,37$ ;  $p = 0,002$ ). Unter Fettbelastung blieb Chemerin weiterhin mit Leptin korreliert, die Korrelationen mit Gesamt- und LDL-Cholesterin waren hingegen erst zum Ende des betrachteten Zeitraums von 6 h nach OLI wieder statistisch signifikant. Zusätzlich traten positive Korrelationen mit CRP ( $t = 4$  h:  $r = 0,32$ ;  $p = 0,009$ ) und Lipocalin-2 ( $t = 4$  h:  $r = 0,25$ ;  $p = 0,041$ ) auf.

In der Subgruppe der übergewichtigen Probanden wurden Korrelationen von basalem Chemerin mit CRP ( $r = 0,56$ ;  $p = 0,001$ ), Leptin ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,002$ ) und dem L/A-Quotient ( $r = 0,42$ ;  $p = 0,013$ ) beobachtet und blieben nach OLI bestehen. Während der Fettbelastung traten vorübergehend signifikante positive Korrelationen mit C-Peptid ( $t = 2$  h:  $r = 0,38$ ;  $p = 0,029$ ) und Insulin ( $t = 2$  h:  $r = 0,42$ ;  $p = 0,014$ ) auf.

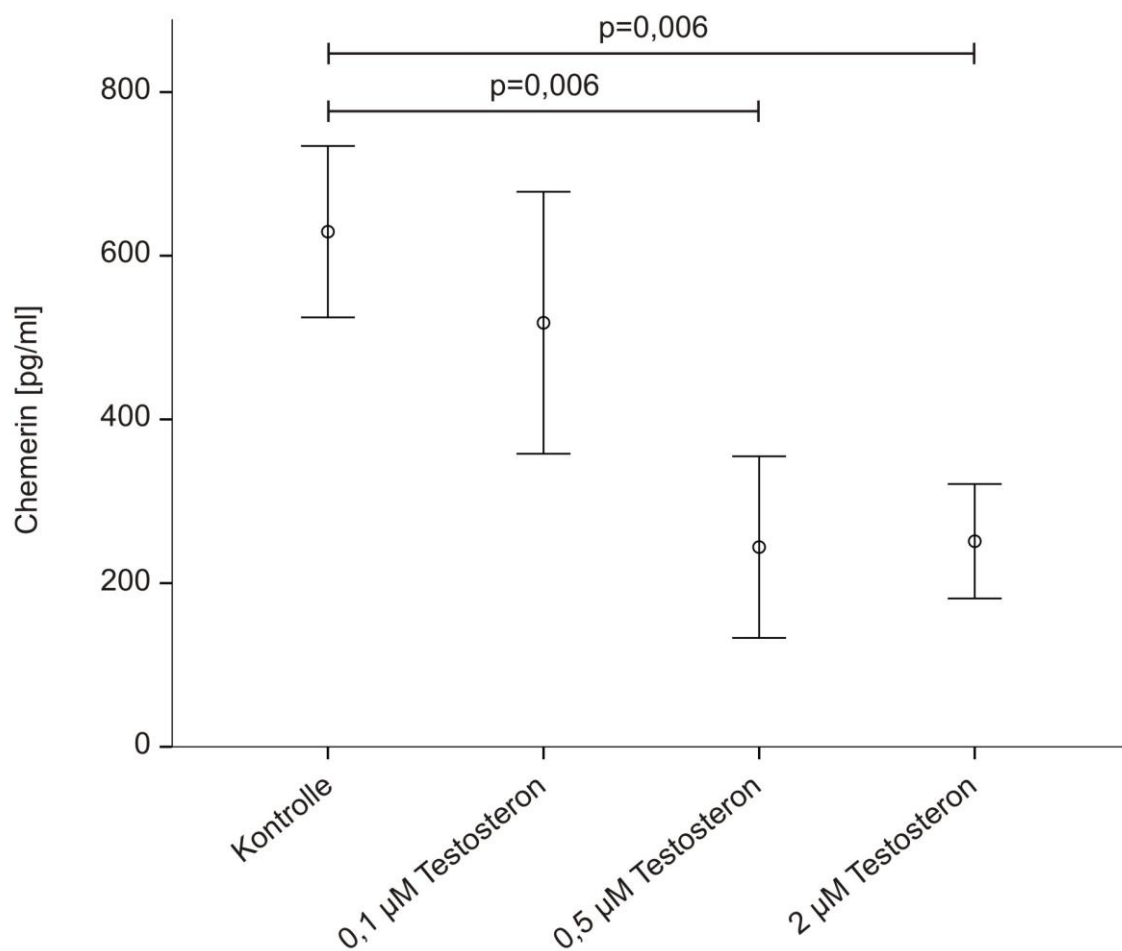
Eine weitergehende Aufteilung des Kollektivs nach BMI und Geschlecht zeigte bei normalgewichtigen Frauen ( $n = 41$ ) einen Zusammenhang zwischen basalem Chemerinspiegel und Leptin ( $r = 0,34$ ;  $p = 0,032$ ) sowie dem L/A-Quotienten ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,015$ ), unter Fettbelastung bestanden positive Korrelationen mit CRP ( $t = 4$  h:  $r = 0,34$ ;  $p = 0,028$ ) und weiterhin mit Leptin. In der Gruppe der übergewichtigen Frauen ( $n = 17$ ) wurde im basalen Zustand eine positive Korrelation von Chemerin mit CRP ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,037$ ) beobachtet, die auch zu den Zeitpunkten 2 h und 6 h nach OLI vorlag.

Unter den normalgewichtigen männlichen Probanden ( $n = 25$ ) war die basale Konzentration von Chemerin signifikant und positiv mit Gesamt- ( $r = 0,54$ ;  $p = 0,006$ ) und mit LDL-Cholesterin ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,008$ ) korreliert. Diese Korrelationen blieben nach OLI bestehen. In der Gruppe der übergewichtigen Männer ( $n = 17$ ) existierten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge von Chemerin mit anthropometrischen und physiologischen Parametern.

#### **3.1.2.4 Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit Sexualhormonen**

Zur Überprüfung und Erklärung der *in vivo* gemachten Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses des Geschlechts auf die Serumkonzentration von Chemerin wurden

Stimulationsexperimente in 3T3-L1 Zellen durchgeführt. Nach Abschluss ihrer Differenzierung wurden reife Adipozyten mit den Sexualhormonen Estradiol (Stocklösung in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Konzentration im Zellüberstand: 0,1 und 1  $\mu\text{M}$ ) und Testosteron (Stocklösung in Ethanol; Konzentration im Zellüberstand: 0,1, 0,5 und 2  $\mu\text{M}$ ) in getrennten Ansätzen jeweils für eine Dauer von 18 h inkubiert. Als Kontrollen dienten in parallelen Ansätzen mit dem jeweiligen Lösungsmittel behandelte Zellen. Während die mit ELISA bestimmte Chemerinkonzentration im Überstand nach Inkubation mit Estradiol unverändert blieb (Daten nicht gezeigt), wurde sie durch hohe Dosen von Testosteron deutlich verringert (Kontrolle:  $629,4 \pm 128,2$  pg/ml; mit 2  $\mu\text{M}$  Testosteron:  $251,1 \pm 78,1$  pg/ml;  $p = 0,006$ ; Abb. 10).

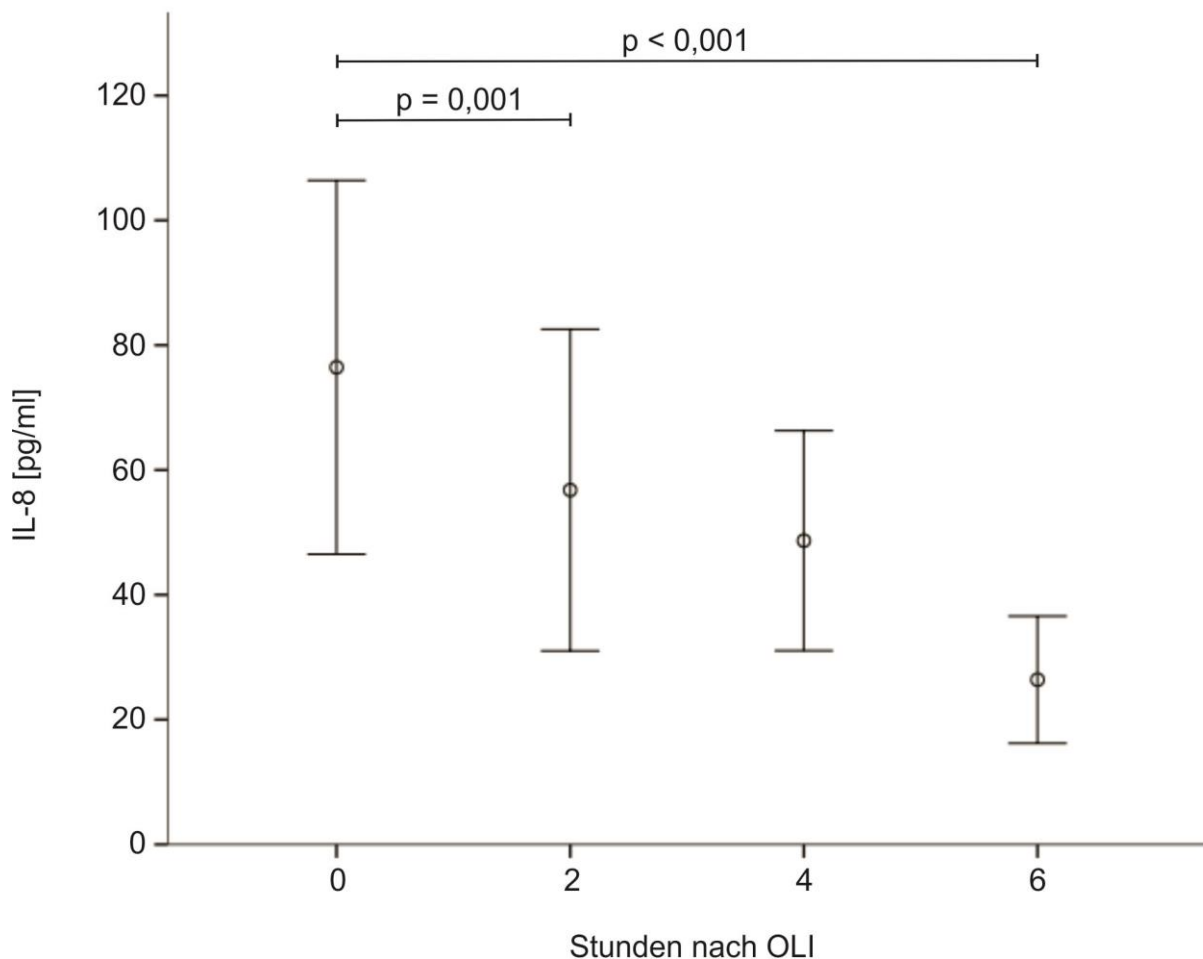


**Abb. 10:** Chemerinkonzentration im Zellüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Testosteron (0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ ) für 18 h.  $n = 6$  im Kontrollansatz mit EtOH und in der Stimulation mit 0,1  $\mu\text{M}$  Testosteron;  $n = 5$  in den Ansätzen mit 0,5 und 2  $\mu\text{M}$  Testosteron.

### 3.1.3 Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches IL-8

#### 3.1.3.1 Serumkonzentrationen vor und nach oraler Fettaufnahme

Die gemessenen Werte von IL-8 in den Blutseren der Probanden streuten über einen sehr breiten Bereich von 4,5 bis 909,1 pg/ml (Mittelwert 76,5 pg/ml, Standardabweichung 138,0 pg/ml). Die Konzentrationen lagen bei 85 der insgesamt 100 Probanden in jeweils allen vier Serumproben innerhalb des messbaren Bereichs und wurden statistisch ausgewertet. Nach Aufnahme der Fettemulsion wurde innerhalb von 6 h ein signifikanter Rückgang auf durchschnittlich  $26,4 \pm 46,9$  pg/ml beobachtet ( $p < 0,001$ ; Abb. 11).



**Abb. 11:** Zeitlicher Verlauf der Serumkonzentration von IL-8 nach OLI. Die Blutproben für die Messungen ( $n = 85$ ) wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach der Fettaufnahme entnommen.



### 3.1.3.2 Bivariate Korrelationen von IL-8 mit Serumparametern

Die basalen Serumspiegel von IL-8 waren positiv mit den Konzentrationen von Resistin ( $r = 0,34$ ;  $p = 0,001$ ), Lipocalin-2 ( $r = 0,38$ ;  $p < 0,001$ ) und Visfatin ( $r = 0,33$ ;  $p = 0,002$ ) korreliert (Tab. 2). Des Weiteren bestand eine hoch signifikante negative Korrelation zwischen IL-8 und dem Glukosespiegel ( $r = -0,47$ ;  $p < 0,001$ ). Unter Fettbelastung wurden diese Zusammenhänge weiterhin beobachtet.

Es wurden keine signifikanten Korrelationen der Serumkonzentration von IL-8 mit BMI, CRP, C-Peptid, Insulin, Cholesterin, Triglyzeridspiegel, Adiponektin und Leptin gefunden.

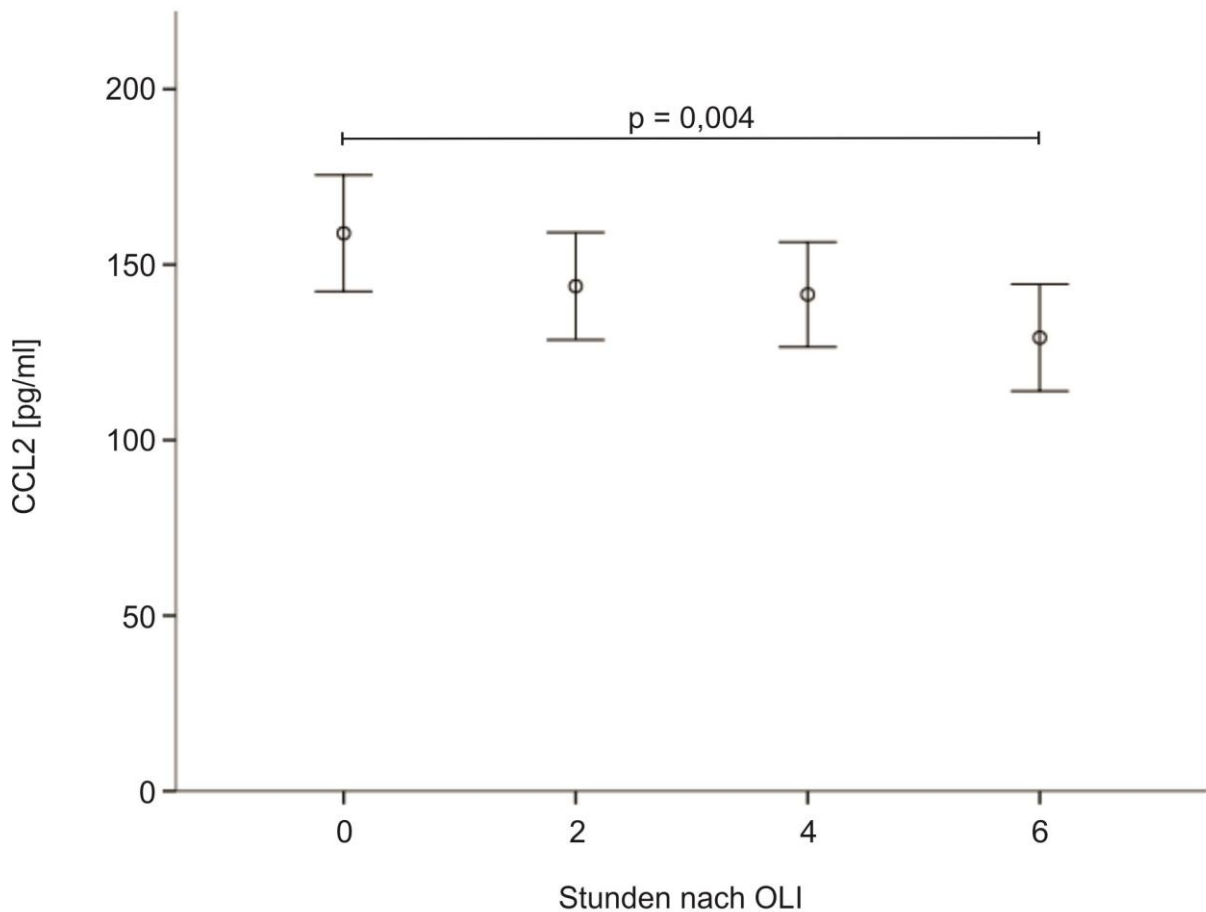
		t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 6 h
IL-8 n = 85	Glukose	$r = -0,47$ $p < 0,001$	$r = -0,51$ $p < 0,001$	$r = -0,54$ $p < 0,001$	$r = -0,37$ $p = 0,001$
	Resistin	$r = 0,34$ $p = 0,001$	$r = 0,44$ $p < 0,001$	$r = 0,38$ $p < 0,001$	$r = 0,42$ $p < 0,001$
	Visfatin	$r = 0,33$ $p = 0,002$	$r = 0,51$ $p < 0,001$	$r = 0,36$ $p = 0,001$	$r = 0,36$ $p = 0,001$
	Lipocalin-2	$r = 0,38$ $p < 0,001$	$r = 0,36$ $p = 0,001$	$r = 0,28$ $p = 0,009$	$r = 0,24$ $p = 0,024$

**Tab. 2:** Bivariate Korrelationen von IL-8 mit Serumparametern zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach Beginn der Fettbelastung.

### 3.1.4 Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches CCL2

#### 3.1.4.1 Serumkonzentrationen vor und nach oraler Fettaufnahme

Die gemessenen basalen Serumspiegel von CCL2 zeigten, ähnlich wie bei IL-8, große individuelle Schwankungen. Bei 96 Probanden lagen die Werte in allen vier Serumproben im messbaren Bereich (vgl. 3.1.3.1), diese streuten in einem Intervall von 32,8 bis 437,2 pg/ml (Mittelwert: 158,9 pg/ml; Standardabweichung: 81,2 pg/ml). Nach Aufnahme der Fettemulsion sank die durchschnittliche Konzentration von CCL2 auf  $129,2 \pm 74,7$  pg/ml ( $t = 6$  h;  $p = 0,004$ ; Abb. 12).



**Abb. 12:** Zeitlicher Verlauf der Serumkonzentration von CCL2 nach OLI. Die Blutproben für die Messungen (n = 96) wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach der Fettaufnahme entnommen.

#### 3.1.4.2 Bivariate Korrelationen von CCL2 mit Serumparametern

Im nüchternen Zustand der Probanden bestanden positive Korrelationen (Tab. 3) der CCL2 Konzentration mit Resistin ( $r = 0,22$ ;  $p = 0,031$ ) und Visfatin ( $r = 0,34$ ;  $p = 0,001$ ) sowie negative Korrelationen mit Adiponektin ( $r = -0,33$ ;  $p = 0,001$ ) und HDL-Cholesterin ( $r = -0,23$ ;  $p = 0,022$ ). Lediglich der Zusammenhang mit Visfatin blieb nach OLI bestehen. Zusätzlich wurden vorübergehende Korrelationen mit Gesamtcholesterin ( $t = 4$  h:  $r = 0,22$ ;  $p = 0,030$ ) sowie Lipocalin-2 ( $t = 6$  h:  $r = 0,29$ ;  $p = 0,004$ ) beobachtet.

Es bestanden keine signifikanten Korrelationen von CCL2 mit BMI, CRP, C-Peptid, Insulin, Glukose und Leptin.

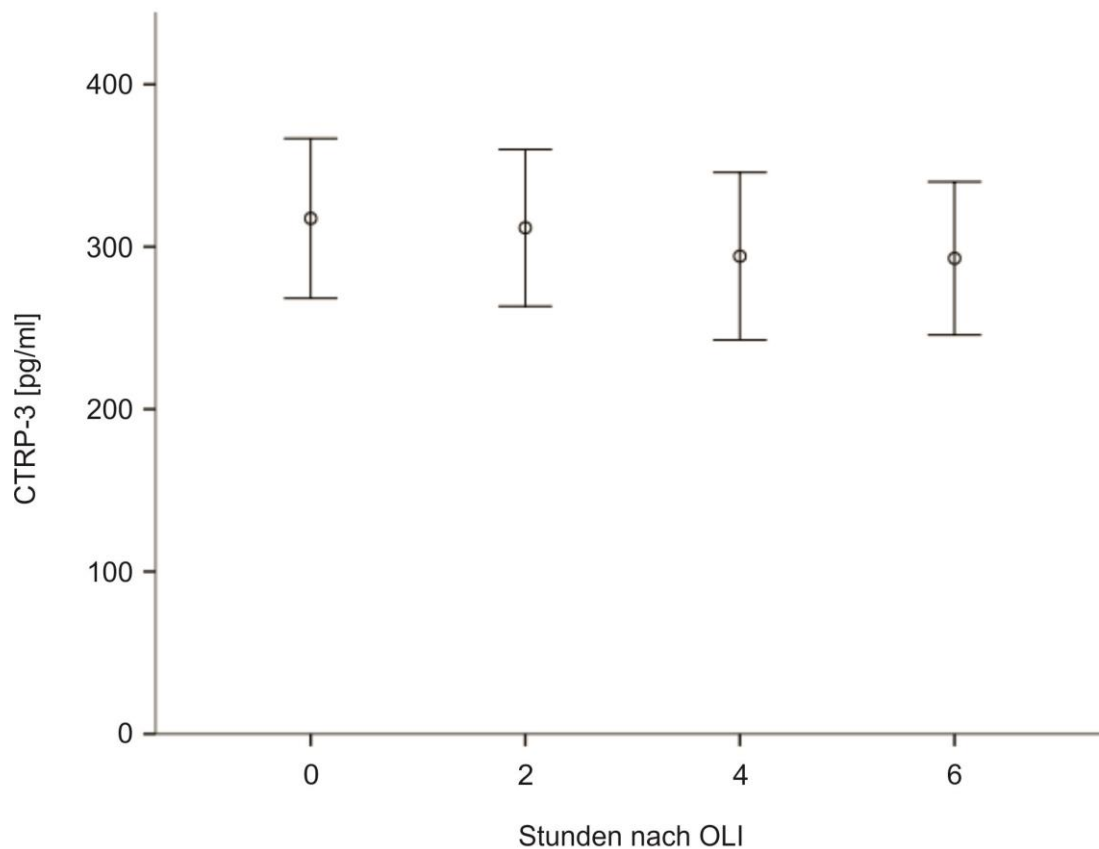
		t = 0 h	t = 2 h	t = 4 h	t = 6 h
CCL2 n = 96	Resistin	r = 0,22 p = 0,031	r = 0,21 p = 0,041	n. s.	n. s.
	Visfatin	r = 0,34 p = 0,001	r = 0,35 p < 0,001	r = 0,24 p = 0,020	r = 0,29 p = 0,004
	Adiponektin	r = -0,33 p = 0,001	r = -0,22 p = 0,034	n. s.	n. s.
	HDL- Cholesterin	r = -0,23 p = 0,022	n. s.	n. s.	n. s.

**Tab. 3:** Bivariate Korrelationen von CCL2 mit Serumparametern zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach Beginn der Fettbelastung.

### 3.1.5 Einfluss einer oralen Fettbelastung auf systemisches CTRP-3

#### 3.1.5.1 Serumkonzentrationen vor und nach oraler Fettaufnahme

Ungeachtet der weitgehenden Erforschung seiner anti-inflammatorischen und metabolischen Funktionen sowie seines Expressionsprofils in verschiedenen Geweben wurden bislang nur wenige quantitative Daten zu im menschlichen Blutkreislauf zirkulierendem CTRP-3 publiziert. Die Serumkonzentration dieses Adipokins wurde bei einer Stichprobe von 15 zufällig ausgewählten Probanden aus dem Kollektiv der beschriebenen Fettbelastungsstudie bestimmt. Der dabei verwendete nicht-kompetitive ELISA Kit ist einer der ersten kommerziell erhältlichen für humanes CTRP-3. Die Messungen ergaben basale CTRP-3 Konzentrationen zwischen 151 pg/ml und 559 pg/ml, mit einem Mittelwert von 317,5 pg/ml und einer Standardabweichung von 95,3 pg/ml. Auf die orale Fettaufnahme hin war ein leichter, statistisch nicht signifikanter Rückgang der durchschnittlichen Serumkonzentration bei den 15 Probanden auf  $292,9 \pm 91,4$  pg/ml zu beobachten (t = 6 h; Abb. 13).



**Abb. 13:** Zeitlicher Verlauf der Serumkonzentration von CTRP-3 nach OLI. Die Blutproben für die Messungen ( $n = 15$ ) wurden zu den Zeitpunkten 0 h und 2, 4 und 6 h nach der Fettaufnahme entnommen.

### 3.1.5.2 Bivariate Korrelationen von CTRP-3 mit Serumparametern

Eine bivariate Korrelationsanalyse der Serumwerte ergab signifikante positive Korrelationen der Konzentration von CTRP-3 mit Lipocalin-2 ( $t = 4$  h:  $r = 0,58$ ;  $p = 0,023$ ) und Resistin ( $t = 6$  h:  $r = 0,55$ ;  $p = 0,035$ ) sowie eine negative Korrelation mit Adiponektin ( $t = 4$  h:  $r = -0,59$ ;  $p = 0,022$ ) nach OLI. CTRP-3 war nicht mit den Parametern BMI, CRP, C-Peptid, Insulin, Glukose, Cholesterin, Triglyzeridspiegel, Leptin, IL-8, CCL2 und Visfatin korreliert.

## 3.2 Versuche zur anti-inflammatorischen Wirkung von CTRP-3 *in vivo*

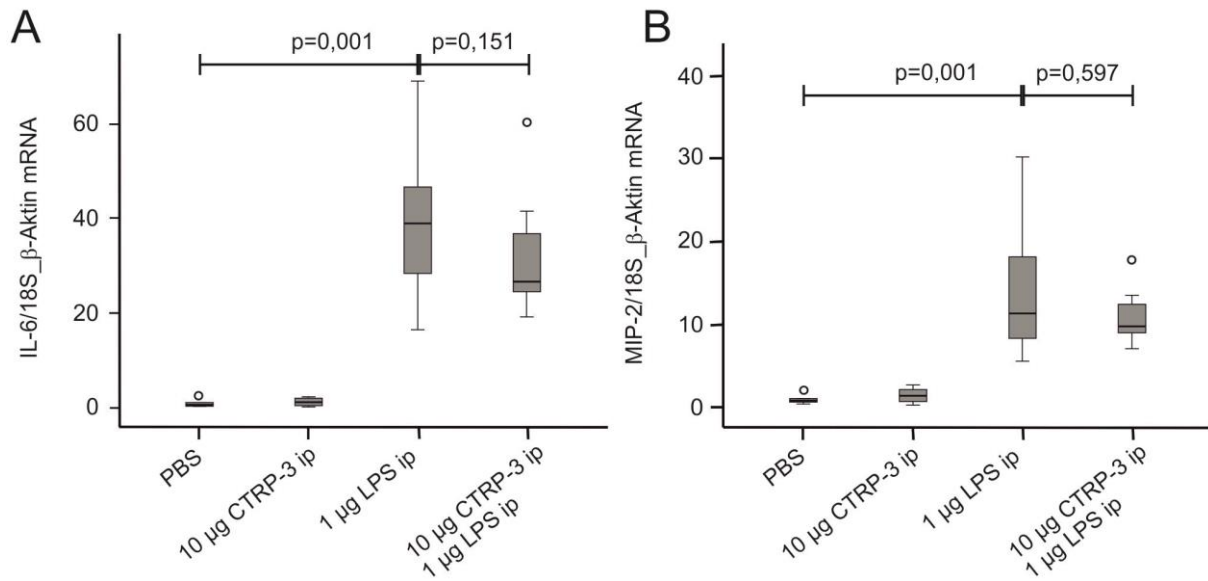
Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von CTRP-3 wurden in vorhergehenden Studien *in vitro* eingehend untersucht und charakterisiert [58]. Auf diesen Erkenntnissen fußend wurden in der Arbeitsgruppe bereits erste Experimente zur Auswirkung einer Applikation des

Adipokins auf den inflammatorischen Zustand eines murinen Entzündungsmodells (SIRS) durchgeführt [121]. Um die dabei erhaltenen Ergebnisse auf eine breitere experimentelle Basis zu stellen, sollten weitere Versuche an diesem Modell erfolgen und dabei insbesondere die Wirkung von intraperitonealer und intravenöser Injektion von CTRP-3 auf die Expression und die systemischen Konzentrationen pro-inflammatorischer Proteine vergleichend analysiert werden.

### **3.2.1 Genexpression und Serumspiegel LPS-induzierter pro-inflammatorischer Proteine nach intraperitonealer Injektion von CTRP-3 in der Maus**

Hierzu wurde 8-12 Wochen alten männlichen Mäusen der Linie C57BL/6N eine Dosis von jeweils 10 µg rekombinant exprimiertem CTRP-3 (gelöst in PBS) in das Intraperitoneum injiziert. Kontrolltieren wurde ein entsprechendes Volumen an PBS gespritzt. Nach 30 min wurde durch intraperitoneale Injektion von bakteriellem LPS (Dosis: 1 µg/Tier) ein akuter inflammatorischer Zustand in den Versuchstieren induziert, bei Kontrolltieren wurden die gleichen Volumina an H<sub>2</sub>O appliziert. Das Experiment endete nach 2 h mit Tötung der Tiere durch CO<sub>2</sub> und anschließender zervikaler Dislokation.

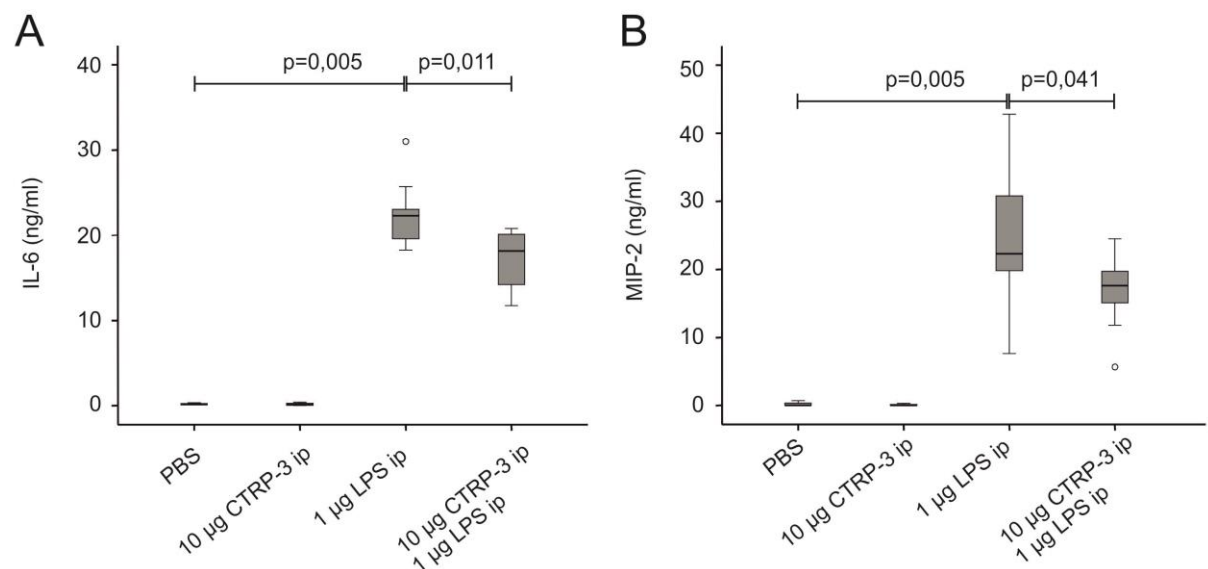
Die Genexpressionsanalyse in den anschließend explantierten und aufgeschlossenen epididymalen Fettgeweben zeigte eine leicht verringerte LPS-induzierte Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 in den mit CTRP-3 vorbehandelten Tieren (relative Werte  $31,9 \pm 3,8$  gegen  $40,0 \pm 5,2$ ;  $p = 0,151$ ; Abb. 14 A). Die Expression des Chemokins MIP-2 wurde durch eine der LPS-Injektion vorausgehende Inkubation mit CTRP-3 nicht beeinflusst ( $10,8 \pm 1,0$  gegen  $13,4 \pm 2,4$ ; Abb. 14 B). Die durch *Real-time* RT-PCR gemessenen relativen mRNA-Mengen von IL-6 und MIP-2 wurden vor der statistischen Auswertung zur Normalisierung jeweils durch den Mittelwert der ebenfalls bestimmten Konzentrationen von 18S rRNA und  $\beta$ -Aktin mRNA dividiert. Bei der Analyse der aus anderen Fettdepots isolierten RNA-Proben traten für eine statistische Auswertung zu große Schwankungen der Messwerte auf (renales Fettgewebe) bzw. wurde keine Wirkung von CTRP-3 festgestellt (subkutanen Fettgewebe).



**Abb. 14:** Relative Genexpression von IL-6 (A) und MIP-2 (B) im epididymalen Fettgewebe von C57BL/6N Mäusen nach intraperitonealer Applikation von CTRP-3 und LPS.

n = 4 in den Kontrollgruppen (PBS + H<sub>2</sub>O bzw. CTRP-3 + H<sub>2</sub>O); n = 9 Versuchstiere mit PBS + LPS; n = 10 Versuchstiere mit CTRP-3 + LPS

Ein deutlicher anti-inflammatorischer Effekt des rekombinanten Adipokins wurde in den zirkulierenden Konzentrationen der beiden untersuchten Proteine beobachtet (Abb. 15), die jeweils signifikant verringert waren (IL-6:  $16974,0 \pm 1132,9$  pg/ml gegen  $22498,5 \pm 1323,8$  pg/ml,  $p = 0,011$ ; MIP-2:  $16772,1 \pm 1660,8$  pg/ml gegen  $25314,9 \pm 3867,0$  pg/ml,  $p = 0,041$ ).

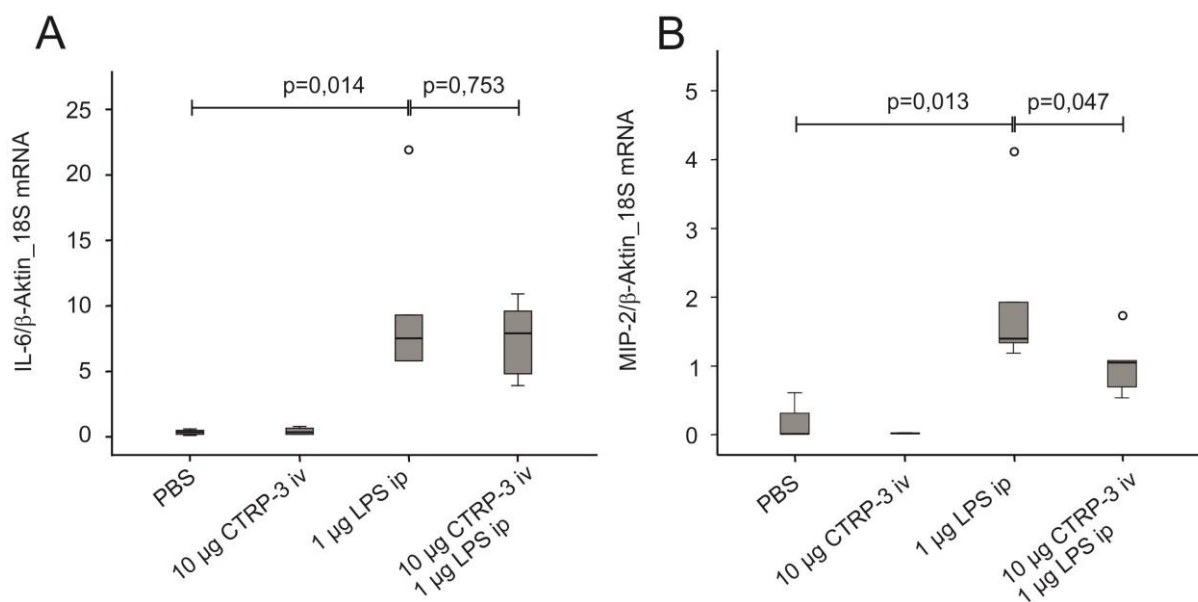


**Abb. 15:** Serumkonzentrationen von IL-6 (A) und MIP-2 (B) in C57BL/6N Mäusen nach ip Applikation von CTRP-3 und LPS.

n = 4 in den Kontrollgruppen (PBS + H<sub>2</sub>O bzw. CTRP-3 + H<sub>2</sub>O); n = 9 Versuchstiere mit PBS + LPS; n = 10 Versuchstiere mit CTRP-3 + LPS

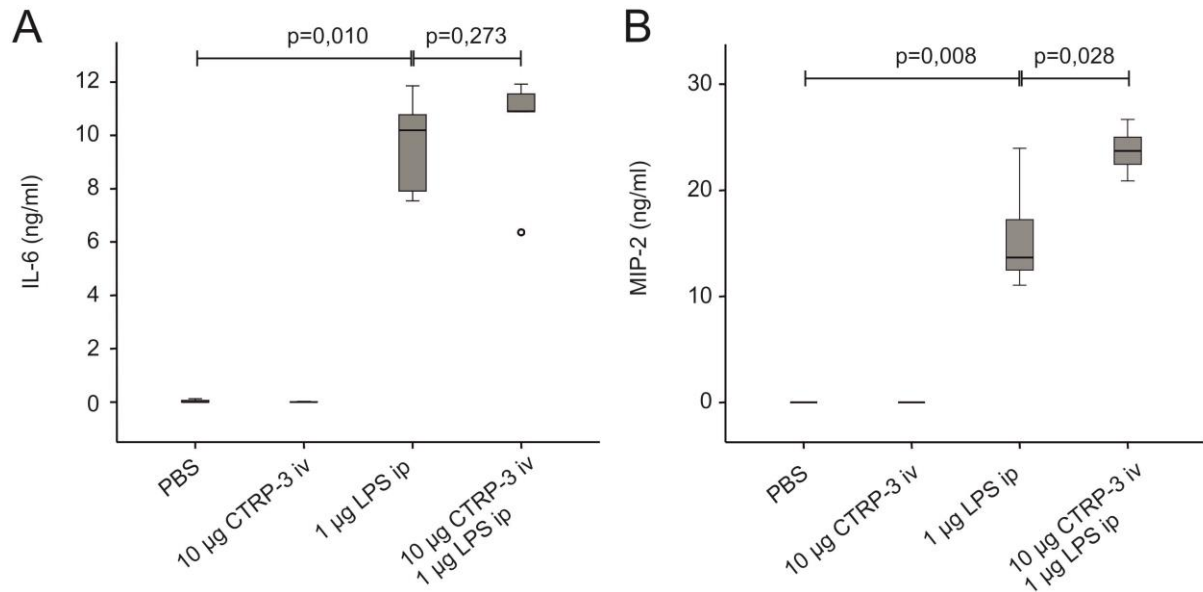
### 3.2.2 Genexpression und Serumspiegel LPS-induzierter pro-inflammatorischer Proteine nach intravenöser Injektion von CTRP-3 in der Maus

In ansonsten analog zu dem unter 3.2.1 beschriebenen Verfahren durchgeführten Experimenten zeigte eine intravenöse anstatt der intraperitonealen Injektion von CTRP-3 (10 µg/Tier) keinen inhibierenden Einfluss auf die LPS-induzierte Erhöhung der Genexpression (Abb. 16) und der Serumspiegel (Abb. 17) der untersuchten pro-inflammatorischen Faktoren. Lediglich die Expression von MIP-2 in epididymalem Fettgewebe war leicht verringert ( $p = 0,047$ ; Abb. 16 B). Zur Normalisierung der Ergebnisse der *Real-time* RT-PCR dienten 18S rRNA und  $\beta$ -Aktin mRNA (vgl. 3.2.1).



**Abb. 16:** Relative Genexpression von IL-6 (A) und MIP-2 (B) im epididymalen Fettgewebe von C57BL/6N Mäusen nach Applikation von CTRP-3 (iv) und LPS (ip).

$n = 4$  in den Kontrollgruppen (PBS + H<sub>2</sub>O bzw. CTRP-3 + H<sub>2</sub>O);  $n = 5$  bei den Versuchstieren (PBS + LPS bzw. CTRP-3 + LPS)



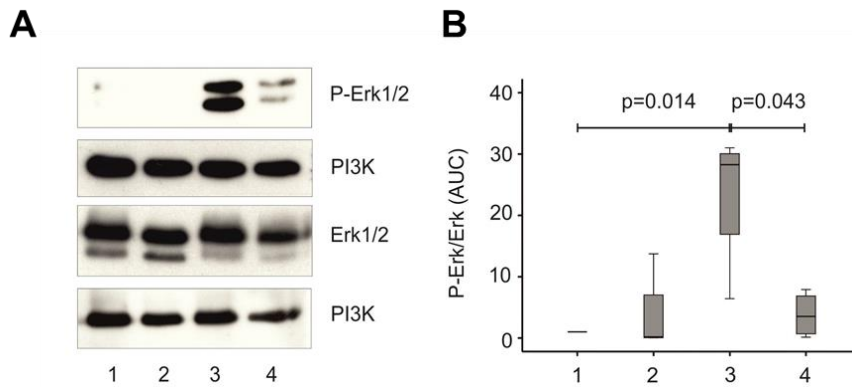
**Abb. 17:** Serumkonzentrationen von IL-6 (A) und MIP-2 (B) in C57BL/6N Mäusen nach Applikation von CTRP-3 (iv) und LPS (ip).

n = 4 in den Kontrollgruppen (PBS + H<sub>2</sub>O bzw. CTRP-3 + H<sub>2</sub>O); n = 6 bei den Versuchstieren (PBS + LPS bzw. CTRP-3 + LPS)

### 3.2.3 Inhibition der LPS-induzierten Aktivierung von Erk1/2 in murinem epididymalem Fettgewebe durch CTRP-3

Aus explantiertem epididymalem Fettgewebe der unter 3.2.1 beschriebenen Versuchstiere wurde Gesamtprotein isoliert und im Western Blot analysiert. Dabei wurde jeweils das Mengenverhältnis der phosphorylierten zur inaktiven Form (p-Erk1/2 bzw. Erk1/2) der beiden MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 bestimmt. Bei diesen handelt es sich um Schlüsselproteine in verschiedenen intrazellulären Signalwegen, die u. a. die Induktion pro-inflammatorischer Genexpression über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB vermitteln. Erwartungsgemäß wurde eine stark erhöhte Phosphorylierung von Erk1/2 infolge der LPS-Applikation beobachtet, die durch Vorbehandlung der Tiere mit rekombinantem CTRP-3 wirkungsvoll inhibiert wurde (relative Signalintensitäten:  $3,8 \pm 1,8$  gegen  $23,5 \pm 5,7$ ;  $p = 0,043$ ; Abb. 18). Als *housekeeping gene* und Beladungskontrolle im Western Blot diente *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* (PI3K).



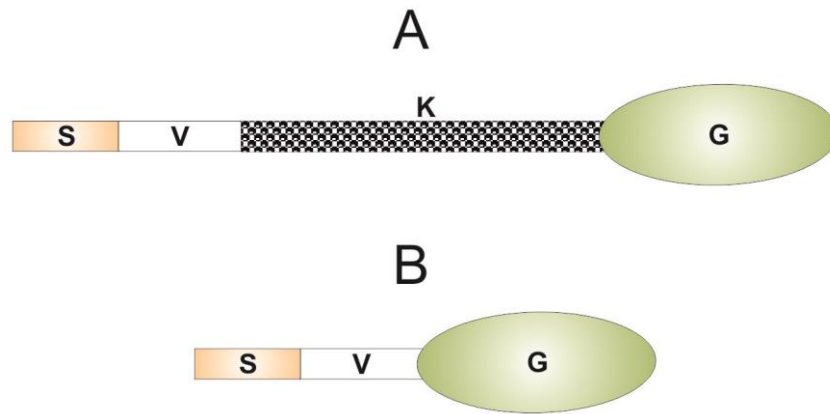


**Abb. 18:** Western Blot (A) und densitometrische Auswertung (B) von Proteinlysaten aus epididymalem Fettgewebe von C57BL/6N Mäusen nach ip Applikation von CTRP-3 und LPS (n = 4; ein exemplarischer Western Blot ist abgebildet). Antikörper gegen Erk1/2, p-Erk1/2 und PI3K (Beladungskontrolle) wurden verwendet.

1 = PBS + H<sub>2</sub>O; 2 = 10 µg CTRP-3 + H<sub>2</sub>O; 3 = PBS + 1 µg LPS; 4 = 10 µg CTRP-3 + 1 µg LPS

### 3.3 Versuche zur rekombinanten Expression der globulären Domäne von CTRP-3 (gCTRP-3) in eukaryotischen Zellen

Die unter 3.2 *in vivo* analysierten anti-inflammatorischen Eigenschaften von CTRP-3 wurden *in vitro* bereits sehr gut charakterisiert. Im Interesse dieser Arbeit stand neben ihrem Nachweis im Mausmodell auch eine mögliche Zuordnung zu definierten molekularen Bestandteilen des Adipokins. Als Eingangshypothese wurde hierbei die C-terminale globuläre, zum Komplementfaktor C1q homologe Domäne von CTRP-3 (Abb. 19 A) als Mediator der entzündungshemmenden Wirkung vermutet. Für den experimentellen Nachweis sollte ein aus diesem Teil des Adipokins, dem für die Sekretion notwendigen Signalpeptid und einer kurzen variablen Region bestehendes rekombinantes Protein (gCTRP-3; Abb. 19 B) exprimiert und aufgereinigt werden. Für diesen Zweck war die Verwendung des Bakulovirus-Expressionssystems in Insektenzellen der Linie H5 vorgesehen, in dem bereits *full-length* CTRP-3 synthetisiert wurde (vgl. 2.2.5).

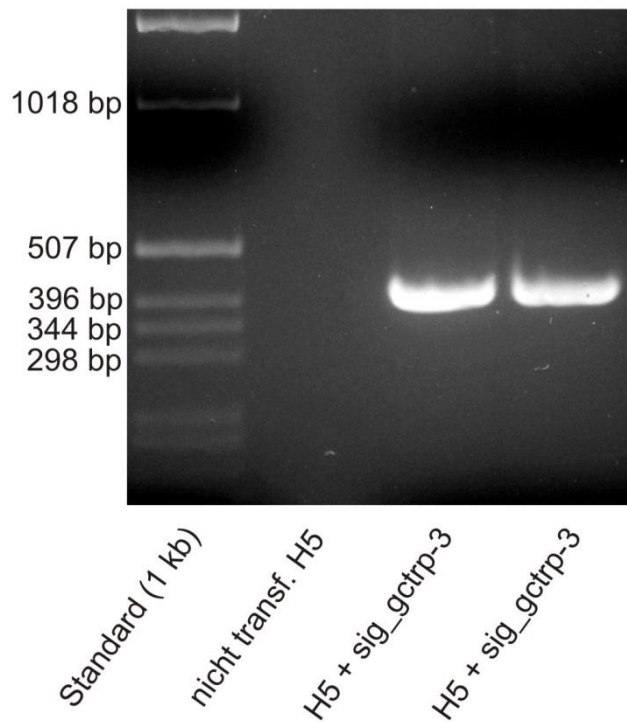


**Abb. 19:** Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von *full-length* CTRP-3 (A) und gCTRP-3 (B). S = Signalpeptid, V = variable Region, K = kollagen-ähnliche Domäne, G = globuläre Domäne

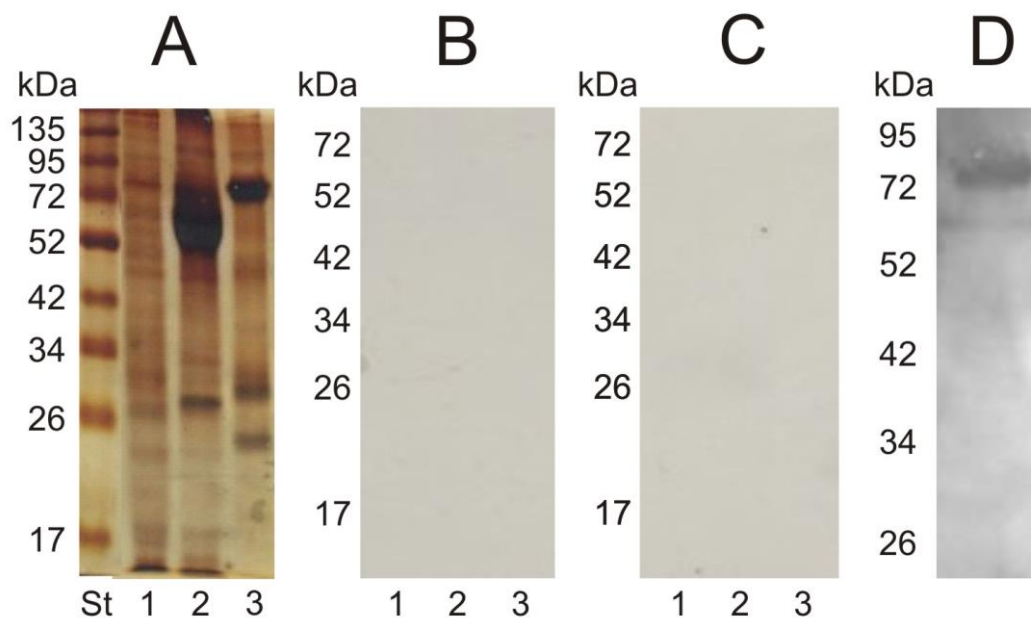
### 3.3.1 Expressionsversuche von gCTRP-3 in H5 Zellen

Nach Insertion des bereits im Vorfeld dieser Arbeit hergestellten Konstrukts sig\_gctrp-3 in den Expressionsvektor pBacPAK9 wurde die Transfektion der DNA zunächst in Sf21 und anschließend in H5 Zellen dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt. Nach 4tägiger Inkubation der transfizierten Zellen bei 27°C wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und wie unter 2.2.5.5 beschrieben gereinigt. Mit der aus Zelllysaten isolierten genomischen DNA wurden Test-PCRs mit den Primern für das eingefügte Genkonstrukt durchgeführt, um die Präsenz des Transgens sig\_gctrp-3 und somit den Erfolg der Transfektion zu überprüfen.

Das Genkonstrukt konnte in den Insektenzellen nachgewiesen werden (Abb. 20), allerdings zeigten die negativen Ergebnisse einer Analyse von Zellüberstand und Eluat der Affinitätschromatographischen Proteinreinigung im Western Blot (Abb. 21 B, C), dass das Zielprotein gCTRP-3 entweder nicht in das Medium sezerniert wurde oder dort zu instabil war. Da verschiedene Variationen des Transfektions- und Zellkulturprotokolls nicht zu verbesserten Ergebnissen führten, wurde ein zweiter Ansatz unter Verwendung der humanen Zelllinie HEK293T/17 verfolgt.



**Abb. 20:** Aus genomischer DNA von transfizierten H5 Zellen durch PCR amplifiziertes sig\_gctrp-3.

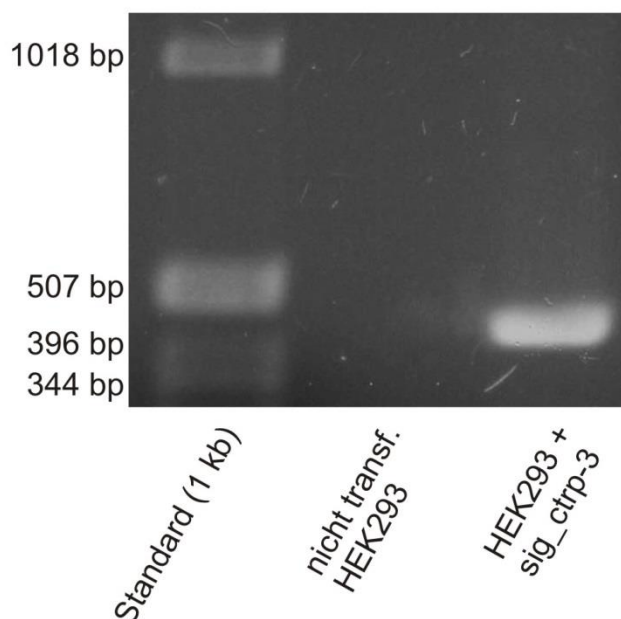


**Abb. 21:** Silbergefärbtes SDS-PA-Gel (A) und Western Blots (B: Anti-CORS26; C: Anti-HN<sub>6</sub>) von H5 Zellüberständen und Reinigungs-Eluaten und ein Western Blot von rekombinantem *full-length* CTRP-3 (D: Anti-CORS26).

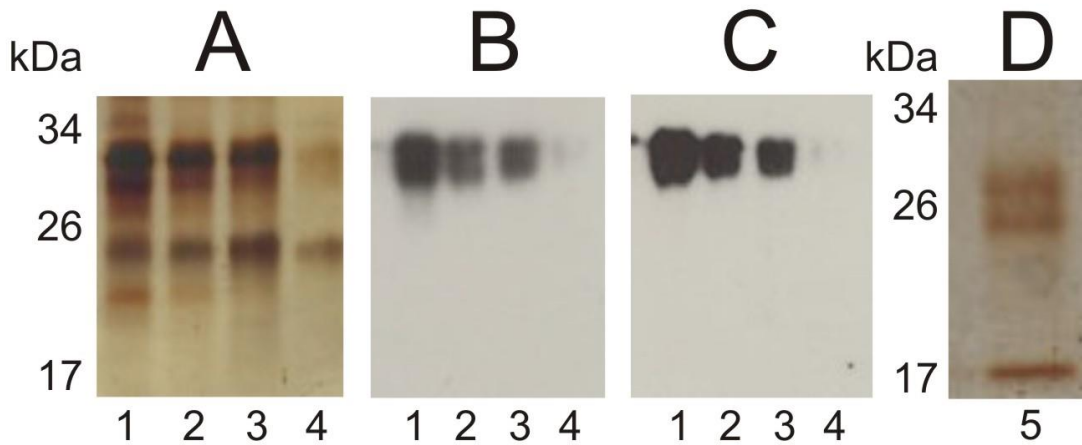
St = Proteinstandard peqGOLD VI; 1 = Zellüberstand von nicht transfizierten H5; 2 = Zellüberstand von transfizierten H5; 3 = Eluat der Affinitätsreinigung aus transfiziertem Zellüberstand (2)

### 3.3.2 Expressionsversuche von gCTRP-3 in HEK293T/17 Zellen

Das Genkonstrukt wurde in den Vektor pIRESneo eingesetzt und dieser unter Verwendung von Lipofectamin in HEK293T/17 Zellen transfiziert. Aufgrund der erfahrungsgemäß relativ geringen Transfektionsrate wurden die transgenen Zellen anschließend zur Selektion über mehrere Wochen hinweg unter Zugabe des Antibiotikums G418 auf Petrischalen kultiviert. Die danach noch vorhandenen Kolonien wurden vereinigt und in Zellkulturflaschen überführt. Wie zuvor in H5 Zellen wurde auch in den selektierten HEK293T/17 der Transfektionserfolg über eine PCR nachgewiesen (Abb. 22). Der Expressionsansatz in serumfreiem Medium zeigte allerdings keine auf eine starke Überexpression hinweisenden Proteinbanden (Abb. 23 A). Die im Western Blot sichtbaren Proteine (Abb. 23 B, C) wurden von den verwendeten Antikörpern scheinbar spezifisch erkannt, im SDS-PA-Gel waren sie jedoch lediglich als schwache Banden sichtbar. Zudem waren sie auch in Kontroll-Ansätzen vorhanden (Abb. 23 D) und repräsentierten wohl im Aufreinigungsprozess unspezifisch angereicherte Proteine.



**Abb. 22:** Aus der genomischen DNA transfizierter HEK293T/17 Zellen durch PCR amplifiziertes sig\_gctrp-3.



**Abb. 23:** Silbergefärbte SDS-PA-Gele (A, D) und Western Blot (B: Anti-CORS26; C: Anti-His<sub>6</sub>) von HEK293T/17 Zellüberständen nach Affinitätsreinigung.

gereinigte Zellüberstände von transfizierten HEK293T/17:

1 = Fraktion #6; 2 = Fraktion #7; 3 = Fraktion #8; 4 = Fraktion #10

5 = Zellüberstand von nicht transfizierten HEK293T/17 nach Affinitätsreinigung

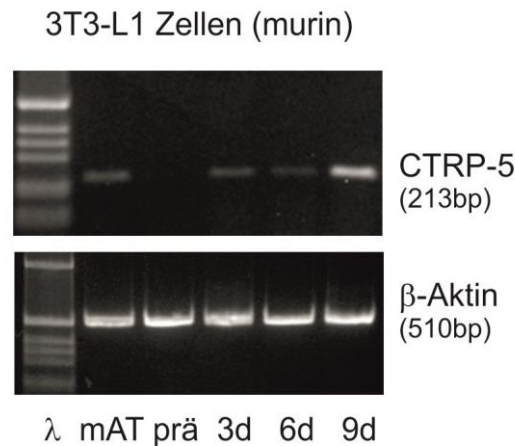
### 3.4 Expression und Funktion von CTRP-5 in Adipozyten

Neben CTRP-3 stand das ebenfalls zu Adiponektin paraloge Protein CTRP-5 im Fokus dieser Arbeit. Vorrangig sollten sein Vorkommen im Blut als zirkulierendes Adipokin sowie seine Expression und zellbiologischen Funktionen in Adipozyten untersucht werden.

#### 3.4.1 Expression von CTRP-5 mRNA in murinem Fettgewebe und in 3T3-L1 Adipozyten

Fibroblasten der Zelllinie 3T3-L1 wurden hormonell über 9 Tage hinweg zu reifen Adipozyten differenziert. Im Laufe dieser Differenzierungsreihe wurde mRNA aus Präadipozyten sowie aus 3, 6 und 9 Tage lang differenzierten Zellen isoliert und die komplementäre cDNA durch Reverse Transkription gebildet. Entsprechend wurde RNA aus epididymalem, verschiedene Zelltypen enthaltendem Fettgewebe von C57BL/6N Mäusen isoliert und revers transkribiert. Mit den erhaltenen cDNA-Proben wurden PCRs mit Primern für CTRP-5 sowie für  $\beta$ -Aktin, das als *housekeeping gene* verwendet wurde, durchgeführt. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Ansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt und die amplifizierten DNA-Fragmente analysiert (Abb. 24). In 3T3-L1 Präadipozyten war keine

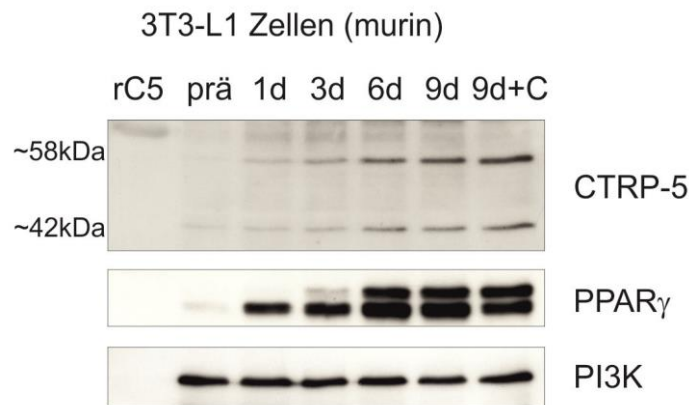
CTRP-5 mRNA nachweisbar, wohingegen im Zuge ihrer Differenzierung zu Adipozyten eine starke Induktion der Genexpression zu beobachten war. Auch im analysierten murinen Fettgewebe lag CTRP-5 mRNA in deutlich detektierbarer Menge vor.



**Abb. 24:** CTRP-5 mRNA Expression in murinem Fettgewebe (mAT) und in 3T3-L1 Zellen vor (prä), während (3d, 6d) und nach der Differenzierung zu Adipozyten (9d) [134]. λ = DNA-Standard (1 kb ladder)

### 3.4.2 CTRP-5 Proteinexpression in 3T3-L1 Adipozyten

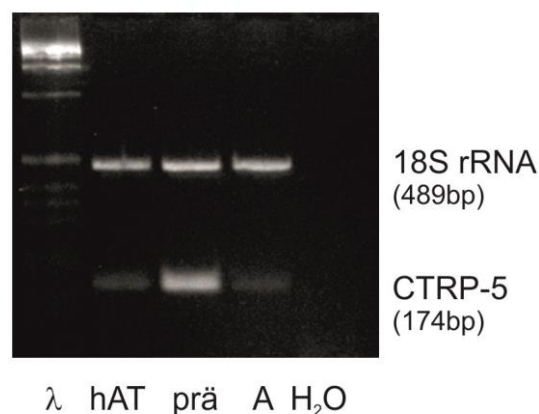
Aus 3T3-L1 Zellen der beschriebenen Differenzierungsreihe (vgl. 3.4.1) wurden Proteinlysate hergestellt und mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der verwendete Antikörper gegen CTRP-5 detektierte zwei Proteinbanden unterschiedlicher Größe (42 und 58 kDa; Abb. 25), die etwas tiefer lagen als das Signal von rekombinant exprimiertem humanem CTRP-5 (ca. 60-65 kDa). Die beiden in den Lysaten gefundenen Banden waren in Präadipozyten kaum sichtbar und waren bei zunehmender Dauer der Differenzierung intensiver ausgeprägt. PPAR $\gamma$  wurde als Differenzierungsmarker, PI3K als Beladungskontrolle und *housekeeping gene* detektiert. Die Ergebnisse legen nahe, dass analog zur Regulation auf Ebene der mRNA auch die Proteinexpression von CTRP-5 während der Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten induziert wird.



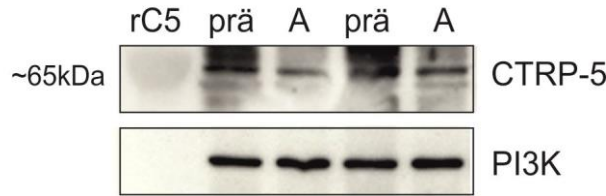
**Abb. 25:** Western Blot von Proteinlysaten aus 3T3-L1 Zellen vor (prä), während (3d, 6d) und nach Differenzierung zu Adipozyten (9d) [134]. Als Kontrolle wurde rekombinant exprimiertes humanes CTRP-5 allein (rC5) und zusammen mit Lysaten differenzierter 3T3-L1 Adipozyten aufgetragen (9d+C). Antikörper gegen CTRP-5, PPAR $\gamma$  (Differenzierungsmarker) und PI3K (Beladungskontrolle) wurden verwendet.

### 3.4.3 Expression von CTRP-5 in primären humanen Präadipozyten und Adipozyten

Analog zu den erläuterten Experimenten in der murinen Zelllinie 3T3-L1 wurde die Expression von CTRP-5 in primären humanen Zellen untersucht. CTRP-5 mRNA wurde sowohl in isolierten humanen Präadipozyten als auch in den daraus differenzierten Adipozyten sowie in humanem Fettgewebe nachgewiesen (Abb. 26). Das Protein wurde im Western Blot in Präadipozyten und in reifen Fettzellen detektiert (Abb. 27).



**Abb. 26:** CTRP-5 mRNA in humanem Fettgewebe (hAT) sowie in humanen primären Präadipozyten (prä) und Adipozyten (A) [134]. 18S rRNA wurde als *housekeeping gene* detektiert. λ = DNA-Standard (1 kb ladder); H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle

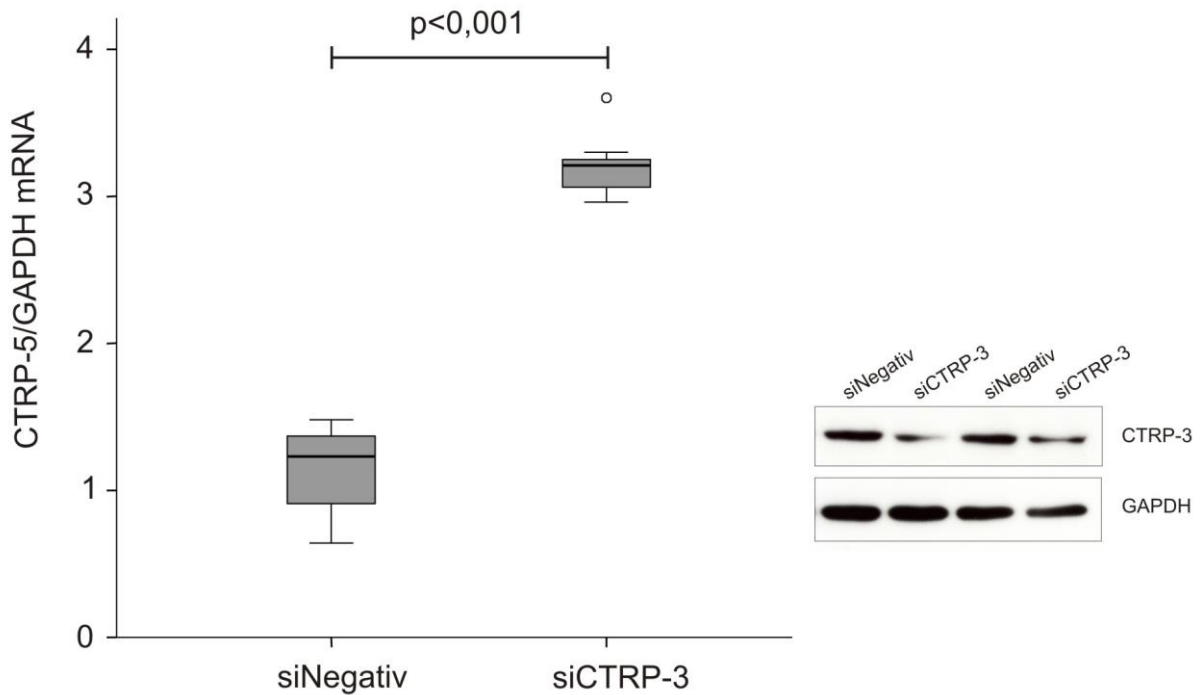


**Abb. 27:** Western Blot von Proteinlysaten aus humanen primären Präadipozyten von zwei verschiedenen Spendern (prä) und aus daraus differenzierten Adipozyten (A) [134]. Als Kontrolle wurde rekombinant exprimiertes humanes CTRP-5 (rC5) aufgetragen. Antikörper gegen CTRP-5 und PI3K (Beladungskontrolle) wurden verwendet.

#### 3.4.4 siRNA vermittelter CTRP-3 *knockdown*: Einfluss auf die Expression von CTRP-5 in 3T3-L1 Adipozyten

Angeichts der Induktion der Genexpression sowohl von CTRP-3 als auch von CTRP-5 während der Differenzierung muriner Adipozyten wurde der Frage nach einem möglichen Zusammenhang in der Regulation dieser beiden Gene nachgegangen. Dazu wurden reife 3T3-L1 Adipozyten mit siRNA behandelt, die einen spezifischen *knockdown* von CTRP-3 bewirkte (Abb. 28). Anschließend wurde die Genexpression von CTRP-5 durch *Real-time* RT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Induktion der Transkription von CTRP-5 infolge des *knockdown* von CTRP-3 – die Konzentration von CTRP-5 mRNA war etwa dreimal so hoch wie in den Kontrollansätzen – und legen die Vermutung nahe, dass ein kompensatorischer Effekt in der Regulation der beiden Adipokine vorliegt.



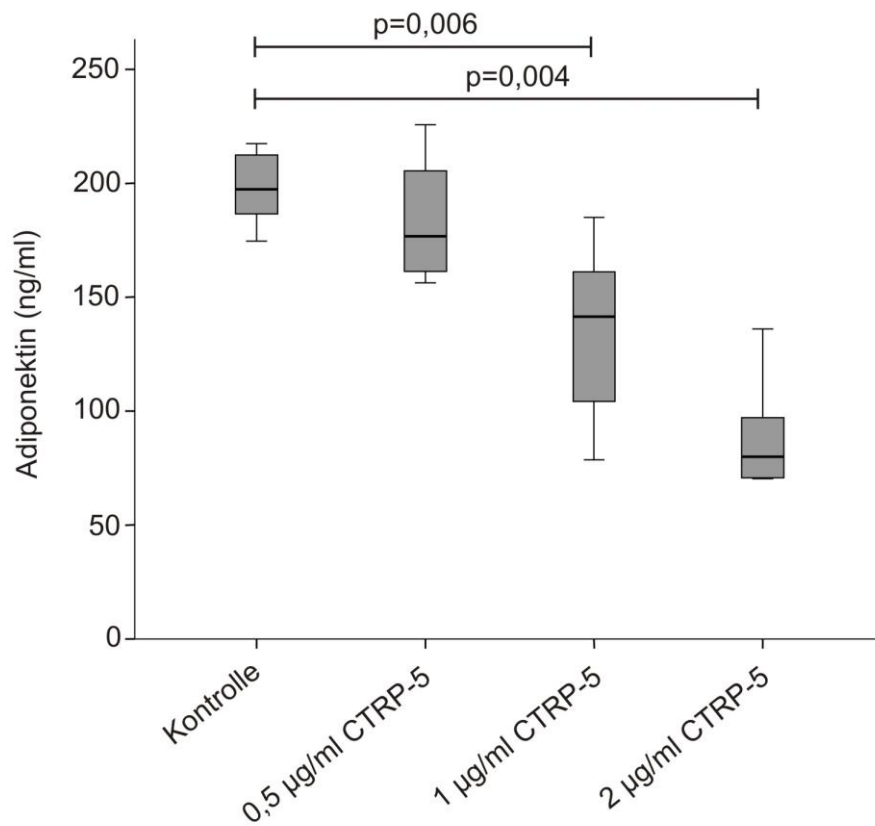


**Abb. 28:** Genexpression von CTRP-5 in 3T3-L1 Adipozyten ( $n = 9$ ) nach *knockdown* von CTRP-3 [134]. Ein Western Blot wurde zur Verifizierung des *knockdown* durchgeführt, dabei wurden Antikörper gegen CTRP-3 und GAPDH (Beladungskontrolle) verwendet.

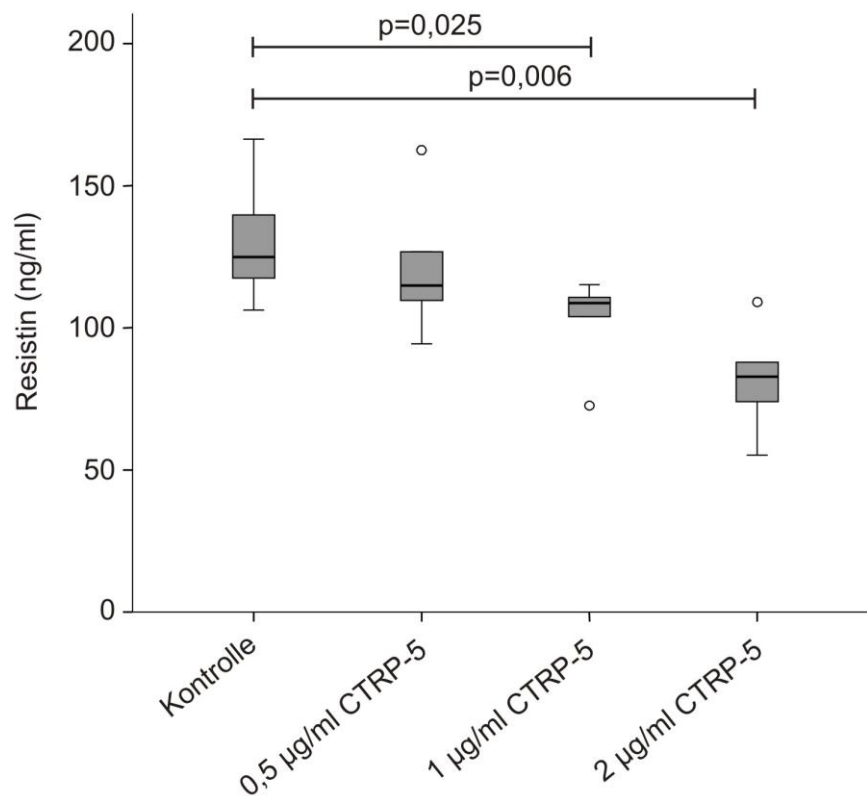
siNegativ = Negativkontrolle (Transfektion der Zellen mit unspezifischer siRNA);  
 siCTRP-3 = siRNA vermittelter *knockdown* von CTRP-3

### 3.4.5 Einfluss von CTRP-5 auf die Adipokin-Sekretion aus 3T3-L1 Adipozyten

Differenzierte 3T3-L1 Adipozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinant exprimiertem humanem CTRP-5 (0,5, 1 und 2  $\mu\text{g/ml}$  in serumfreiem Medium) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden in den Zellkulturüberständen die Konzentrationen von Adiponektin (Abb. 29) und Resistin (Abb. 30) via ELISA bestimmt. Die Mengen beider Adipokine waren nach Inkubation mit CTRP-5 deutlich verringert. Die beobachteten Effekte waren dosisabhängig und jeweils ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}$  CTRP-5 pro ml Medium statistisch signifikant. Die stärkste Reduktion wurde durch 2  $\mu\text{g/ml}$  an rekombinantem Protein bewirkt, dabei gingen die Konzentrationen von Adiponektin um 55% ( $p = 0,004$ ) und von Resistin um 37% ( $p = 0,006$ ) zurück.



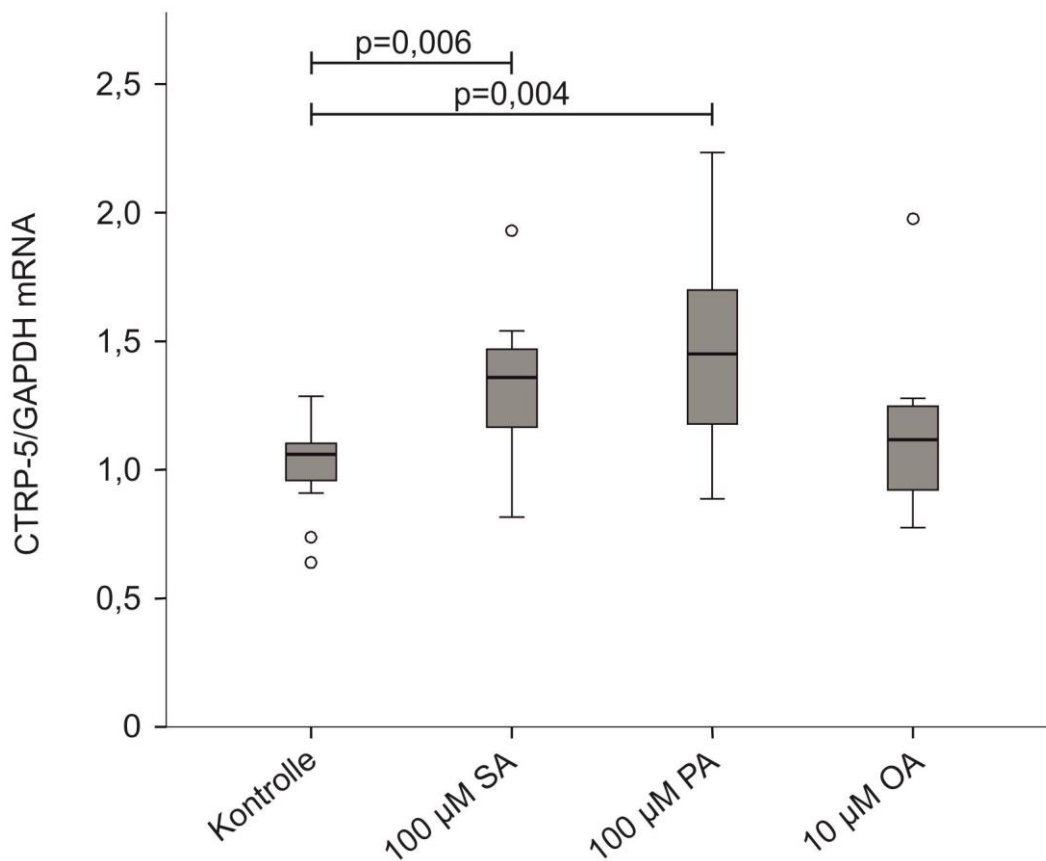
**Abb. 29:** Sekretion von Adiponektin aus 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit CTRP-5 [134]. n = 6



**Abb. 30:** Sekretion von Resistin aus 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit CTRP-5 [134]. n = 6

### 3.4.6 CTRP-5 Expression in 3T3-L1 Adipozyten unter dem Einfluss von freien Fettsäuren

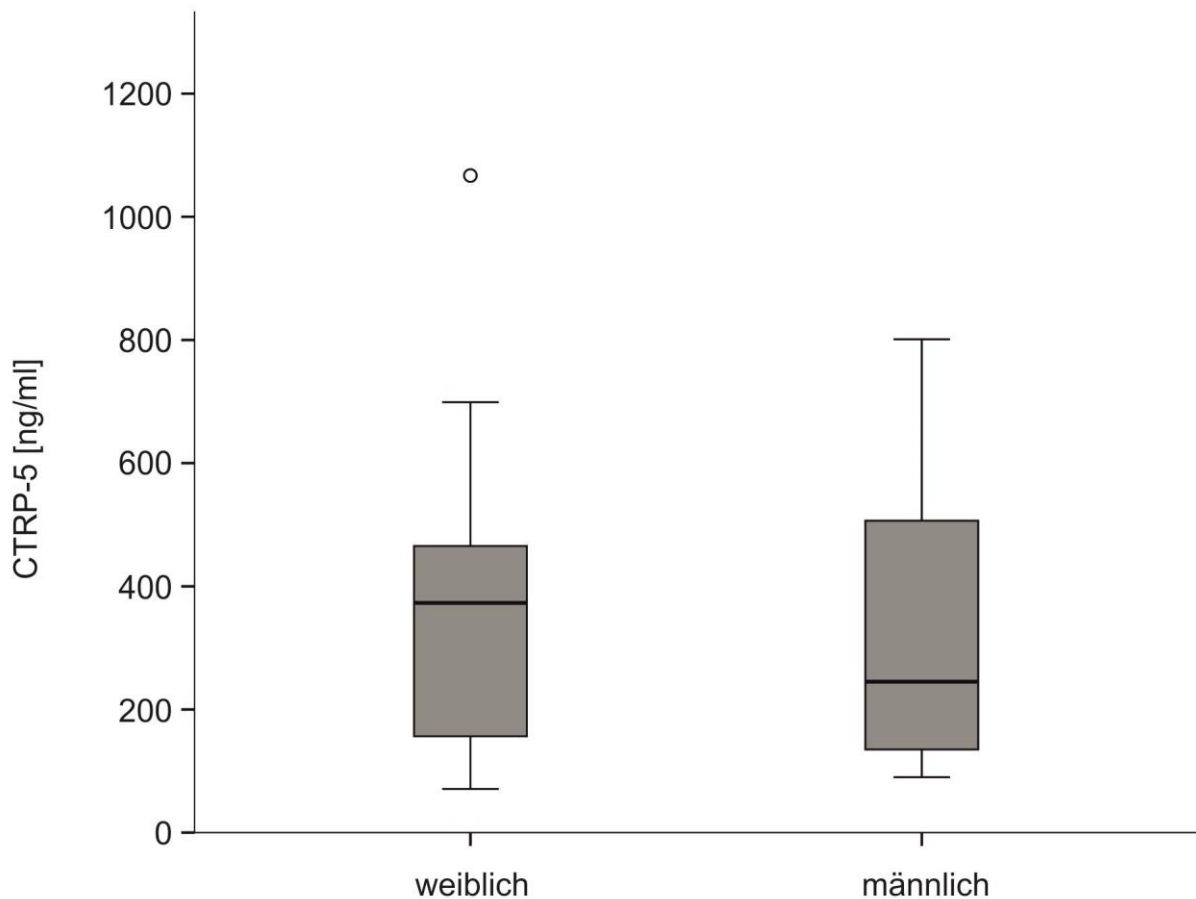
Um potentielle regulatorische Effekte von freien Fettsäuren auf die Synthese von CTRP-5 zu untersuchen, wurden reife 3T3-L1 Adipozyten in getrennten Ansätzen über Nacht mit den gesättigten Carbonsäuren Stearinsäure und Palmitinsäure (SA bzw. PA; jeweils 100  $\mu$ M in serumfreiem Medium) sowie mit der einfach ungesättigten Ölsäure (OA; 10  $\mu$ M in Medium) inkubiert. Anschließend wurde aus den Zellen RNA isoliert und die relative Menge an CTRP-5 mRNA durch *Real-time* RT-PCR bestimmt. Die beiden gesättigten Fettsäuren zeigten jeweils einen signifikanten induzierenden Effekt auf die Genexpression von CTRP-5 ( $p = 0,006$  bei SA,  $p = 0,004$  bei PA), wohingegen die Inkubation der Zellen mit Ölsäure keine Auswirkung darauf hatte (Abb. 31).



**Abb. 31:** Genexpression von CTRP-5 in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit Stearinsäure (SA), Palmitinsäure (PA) und Ölsäure (OA) [134]. Kontrolle = Ansatz mit BSA/EtOH; n = 12

### 3.4.7 Zirkulierendes CTRP-5 in humanem Serum

Bislang fehlten in der Literatur Daten über Vorkommen und Konzentration von CTRP-5 in humanem Blutserum. In dieser Arbeit wurden die basalen CTRP-5 Spiegel in Serumproben von 50 zufällig ausgewählten gesunden Probanden aus einem bereits vorhandenen Kollektiv (vgl. 2.1.13.2) bestimmt (Abb. 32, Tab. 4). Der für die Messungen verwendete ELISA Kit ist einer der ersten kommerziell verfügbaren *Assays* für humanes CTRP-5. Die Serumspiegel lagen in einem gut messbaren Bereich und hatten einen Mittelwert von 343,4 ng/ml, dabei zeigte sich eine breite Streuung der individuellen Konzentrationen (zwischen 71 und 1067 ng/ml; Median bei 366,5 ng/ml; Standardabweichung: 223,7 ng/ml). Männliche und weibliche Probanden wiesen annähernd gleiche Mittelwerte auf, ferner waren keine Korrelationen der CTRP-5 Serumkonzentrationen mit Alter und BMI der Probanden zu beobachten.



**Abb. 32:** Konzentration von CTRP-5 in humanem Serum (modifiziert nach [134]).

	Probanden n = 50
Weiblich	27
Männlich	23
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22,9 ± 0,6
Alter (Jahre)	25,1 ± 0,7
CTRP-5 (ng/ml)	343,4 ± 223,7

**Tab. 4:** Geschlechterverteilung sowie Durchschnittswerte für BMI, Alter ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts) und CTRP-5 Konzentration ( $\pm$  Standardabweichung) in den untersuchten Serumproben (modifiziert nach [134]).

### 3.4.8 Genotypisierung des SNP rs9640 (T/A) in gesunden Probanden und in Diabetikern

In einer groß angelegten japanischen Studie wurde im Jahr 2008 ein Zusammenhang zwischen dem 1014T→A Polymorphismus (SNP rs9640) in der nicht-translatierten Region am 3'-Ende des CTRP-5 Gens und dem Auftreten des MetS beschrieben. Zudem wurden bei heterozygoten Trägern der Punktmutation (Genotyp TA) tendenziell höhere BMI-Werte als bei Kontrollpersonen (Genotyp TT) festgestellt. Homozygote SNP-Träger (Genotyp AA) wurden nicht gefunden [135]. Um die Übertragbarkeit dieser Beobachtungen auf ein europäisches Kollektiv zu prüfen, wurde eine entsprechende Genotypisierung in Blutproben von jeweils 100 gesunden Probanden und Typ 2 Diabetikern (mit deutlich höherem durchschnittlichem BMI) vorgenommen. Dabei wurde in beiden Gruppen eine sehr ähnliche Verteilung der Genotypen TT, TA und AA festgestellt (Tab. 5). Ihre Häufigkeit entsprach jeweils dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht [136, 137]. Die in der zitierten Studie beschriebene Korrelation des Vorliegens von SNP rs9640 mit dem BMI der jeweiligen Probanden sowie eine Assoziation mit einer Erkrankung an Typ 2 Diabetes wurden in den hier untersuchten Kollektiven nicht festgestellt.

	Gesunde Probanden	Typ 2 Diabetes Patienten
Weiblich	55	46
Männlich	45	54
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21,7 ± 0,3*	28,3 ± 0,7*
Alter	26,6 ± 0,2	62,8 ± 1,1
Homozygot T (Wildtyp)	71	74
Heterozygot	26	24
Homozygot A	3	2

**Tab. 5:** Charakteristika (Alter und BMI: ± Standardfehler des Mittelwerts) und Genotyp-Verteilung der untersuchten Kollektive von Typ 2 Diabetes Patienten und gesunden Kontrollen (modifiziert nach [134]). \*  $p < 0,001$

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Adipozytäre und zirkulierende Konzentrationen von Chemerin, IL-8 und CCL2 bei Hyperlipidämie

Nach oraler Fettbelastung verringerte sich die durchschnittliche Serumkonzentration von Chemerin im Studienkollektiv in geringem, jedoch statistisch signifikantem Maße. Diese Beobachtung steht in scheinbarem Widerspruch zu den Ergebnissen der *in vitro* durchgeführten Experimente, die eine Induktion der Chemerinsekretion aus 3T3-L1 Adipozyten infolge einer Stimulation mit Ölsäure und Linolsäure zeigten, insbesondere da es sich hierbei um zwei in der für die Studie verwendeten Fettemulsion sehr häufig auftretende Fettsäuren handelt. Auch früher publizierte Daten dokumentierten eine positive Regulation der Chemerinsekretion aus Adipozyten infolge einer Stimulation mit Fettsäuren *in vitro* [138], wenngleich diese Effekte in einem deutlich längeren Zeitraum (72 h) beobachtet wurden. Bei der vorliegenden, sehr kurzfristig auftretenden Veränderung *in vivo* ist somit wohl eine eher auf aktiver Verringerung der zirkulierenden Proteinmenge als auf reduzierter Sekretion des Adipokins beruhende Regulation zu vermuten. Für Chemerin sind mehrere alternativ oder sequenziell im Serum ablaufende proteolytische Modifikationen bekannt, welche die Spaltung des sezernierten Prochemerins in verschiedene Isoformen unterschiedlicher Aktivität sowie die Inaktivierung und die Induktion von reifem Chemerin umfassen [111, 139]. Möglicherweise ist der beobachtete Rückgang der gemessenen Konzentration eine Folge proteolytischer Umwandlungen und ggf. daraus resultierender Strukturveränderungen. Derartige Prozesse könnten die Bindungsaffinität für die im ELISA verwendeten primären Antikörper entscheidend verringern, auch könnten deren Bindungsstellen direkt von einer Spaltung des Peptidrückgrats betroffen sein. Mangels vorliegender Informationen über deren Lokalisation in der primären und tertiären Struktur von Chemerin kann über einen potentiellen Einfluss von Spaltungsereignissen auf die gemessene Serumkonzentration des Adipokins lediglich spekuliert werden, nichtsdestotrotz bietet er eine mögliche Erklärung für den beobachteten kurzfristigen Rückgang des Chemerinspiegels.

Bei der Einteilung des Studienkollektivs in Untergruppen wurde eine deutliche und statistisch signifikante Differenz in den Chemerinkonzentrationen von männlichen und weiblichen Probanden beobachtet. So lag der basale Durchschnittswert bei Frauen (n = 58) um fast 20% über dem der Männer (n = 42). Diese geschlechtsabhängigen Unterschiede befinden sich in

Übereinstimmung mit der in einer früheren Publikation beschriebenen höheren Expression von Chemerin in weiblichem Fettgewebe [140], zumal Adipozyten, Präadipozyten und die SVC als die Hauptquelle des zirkulierenden Chemerins und die Beiträge der Leber und anderer Organe als relativ gering einzustufen sind. In anderen Studien wurde allerdings kein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Serumkonzentration gefunden. Die abweichenden Beobachtungen können auf unterschiedliche Rahmenbedingungen bei der Durchführung des Fettbelastungsversuchs, insbesondere auch hinsichtlich der Form und Zusammensetzung des dabei aufgenommenen Lipid-Präparats, oder auf Eigenschaften der untersuchten Kollektive, wie Alterszusammensetzung und Gesundheitszustand, zurückzuführen sein. So stammten die hier analysierten Serumproben ausschließlich von gesunden Probanden, andere Studien untersuchten z. B. Gruppen von Patienten mit metabolischen Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes [116, 141]. Bei der Interpretation der Ergebnisse mancher früherer Studien sind zudem die teilweise sehr geringen Fallzahlen zu beachten, aufgrund derer relativ schwache Einflüsse auf die zirkulierende Proteinkonzentration, wie der hier beobachtete des Geschlechts, verborgen bleiben können. Ein weiterer Geschlechtsunterschied bestand darin, dass in der weiblichen Subgruppe signifikant erhöhte Chemerinkonzentrationen bei übergewichtigen Probandinnen gefunden und damit die Beobachtungen früherer Studien [140] bestätigt wurden, während innerhalb der männlichen Subgruppe keine BMI-abhängigen Unterschiede auftraten. Bei einer Unterteilung des Kollektivs nach dem BMI wurde ferner beobachtet, dass der leichte Rückgang von zirkulierendem Chemerin auf die Subgruppe der normalgewichtigen Probanden ( $\text{BMI} < 25$ ;  $n = 66$ ) beschränkt war und bei den übergewichtigen Studienteilnehmern nicht stattfand.

Eine bivariate Korrelationsanalyse des gesamten Kollektivs zeigte statistisch signifikante positive Korrelationen zwischen dem basalen Chemerinspiegel und den Serumkonzentrationen von CRP, C-Peptid, Insulin, Triglyzeriden, Gesamt- und LDL-Cholesterin und Leptin. Die meisten dieser im basalen, nüchternen Zustand der Probanden beobachteten Zusammenhänge bestanden unter Fettbelastung fort. Eine Unterteilung des Kollektivs nach dem Geschlecht zeigte, dass Korrelationen der basalen Chemerinkonzentration mit anderen Serumparametern sowie mit dem BMI auf die Subgruppe der weiblichen Probanden beschränkt waren und bei den männlichen Studienteilnehmern nicht auftraten. Diese Beobachtungen unterstützen die durch die Unterschiede bei den Serumkonzentrationen nahe gelegte Vermutung einer geschlechtsabhängigen Regulation von zirkulierendem Chemerin. Sie wird bekräftigt durch die Ergebnisse von *in vitro* durchgeführten Stimulationsexperimenten an 3T3-L1 Adipozyten, die keinen regulatorischen



Einfluss von Estradiol, hingegen eine deutliche und signifikante Inhibition der Chemerinsekretion durch Testosteron zeigten.

Bei einem Vergleich der Gruppen von normal- und übergewichtigen Probanden wurden im basalen Zustand BMI-abhängige Unterschiede gefunden. So traten die signifikanten Korrelationen von Chemerin mit Gesamt- und LDL-Cholesterin lediglich bei den Normalgewichtigen auf, der Zusammenhang zwischen basaler Chemerin- und CRP-Konzentration war hingegen spezifisch für die Gruppe der übergewichtigen Testpersonen. Chemerin war in beiden Subgruppen mit Leptin korreliert, ferner bestanden die positiven Korrelationen mit Leptin und CRP unter Fettbelastung sowohl bei normal- als auch bei übergewichtigen Probanden.

Die Serumspiegel der pro-inflammatorischen Proteine IL-8 und CCL2 waren unter Fettbelastung signifikant verringert, insbesondere der Rückgang der Konzentration von IL-8 fiel sehr deutlich aus. Diese Beobachtungen widersprechen den initialen Erwartungen, wonach die auf die orale Fettaufnahme folgende deutliche Zunahme zirkulierender Triglyzeride und Fettsäuren zu einer verstärkten Lipideinlagerung in Adipozyten und in der Konsequenz zu einer Induktion pro-inflammatorischer Genexpression führen würde. Die Ergebnisse bestätigten indessen die *in vitro* bei Kurzzeitstimulation (2, 4 und 6 h) von 3T3-L1 Adipozyten mit freien Fettsäuren beobachteten Veränderungen der Zytokinkonzentrationen im Zellüberstand. Hierbei wurde eine deutliche Inhibition der Sekretion von IL-8 und CCL2 durch die ungesättigten Carbonsäuren Ölsäure und Linolsäure festgestellt, welche in großen Mengenanteilen in der für die OLI verwendeten Fettemulsion vorkommen. Palmitinsäure, als in dem Präparat häufig auftretende gesättigte Fettsäure, bewirkte eine vorübergehende Reduktion von IL-8 und induzierte die Freisetzung von CCL2. Signifikante Korrelationen von IL-8 und CCL2 mit der Konzentration der zirkulierenden Triglyzeride wurden in der vorliegenden Studie nicht gefunden. Neben positiven Korrelationen mit den pro-inflammatorischen Faktoren Resistin und Lipocalin-2 sowie mit dem Adipokin Visfatin wurde ein stark negativer, durch die Fettbelastung nicht wesentlich beeinflusster Zusammenhang zwischen IL-8 und dem Blutglukosespiegel gefunden. Diese Korrelation könnte ein Hinweis auf eine direkte oder indirekte regulatorische Beziehung zwischen diesem inflammatorischen Zytokin und Prozessen des Glukose-Stoffwechsels sein.

Die beobachtete Entwicklung der Konzentrationen von IL-8 und CCL2 in Blutserum und Zellkulturüberständen unter Fettbelastung deuten auf eine zumindest kurzzeitige anti-inflammatorische Wirkung ungesättigter Fettsäuren auf das Sekretionsprofil von Adipozyten hin, die sich in den Serumspiegeln von in den Entzündungsprozess involvierten Proteinen

niederschlägt. Dieser hypothetische Zusammenhang steht in Gegensatz zur Annahme eines generell entzündungsfördernden Einflusses einer erhöhten Zufuhr von langkettigen Fettsäuren im Fettgewebe. In diesem Kontext wurden für zirkulierendes IL-8 eine positive Korrelation mit dem BMI [142] sowie ein reduzierender Einfluss durch eine Umstellung auf fettarme Ernährung festgestellt [143]. Vor diesem Hintergrund liegt die Vermutung nahe, dass die hier beobachteten Effekte nach OLI möglicherweise charakteristische Eigenschaften der in der vorliegenden Studie hauptsächlich verwendeten Fettsäuren widerspiegeln. So wurden in einer früheren Publikation eine negative Korrelation von pro-inflammatorischen Zytokinen mit dem Anteil von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung und ein dem entgegengesetzter Zusammenhang mit gesättigten Fettsäuren beschrieben [144]. Möglicherweise verweisen die Ergebnisse auf grundlegend unterschiedliche Konsequenzen von überwiegend gesättigte bzw. ungesättigte Fettsäuren beinhaltender Ernährung für metabolische und inflammatorische Prozesse. Selbstverständlich ist bei der Interpretation der hier erhobenen Daten das kurze zeitliche Intervall der durchgeführten Studie zu bedenken, das Rückschlüsse von den beobachteten Effekten auf langfristige Auswirkungen von generell unbalancierter Fettaufnahme und daraus resultierender Hyperlipidämie nur in begrenztem Umfang zulässt. Dennoch können die Ergebnisse dieser Kurzzeit-Studie Hinweise auf durch die Lipid-Zufuhr initial ausgelöste Mechanismen und Prozesse insbesondere im Fettgewebe geben, welche die weitere Entwicklung unter Fettbelastung beeinflussen und vorgeben.

Die durchschnittliche Serumkonzentration des anti-inflammatorischen Adipokins CTRP-3 in 15 untersuchten Probanden des Kollektivs wurde durch die Lipid-Aufnahme nicht signifikant beeinflusst. Eine Korrelationsanalyse ergab unter Fettbelastung ( $t = 4$  h) eine signifikante negative Korrelation mit Adiponektin, eine Beobachtung, die in scheinbarem Widerspruch mit der positiven Regulation der Adiponektin-Sekretion durch CTRP-3 [57] steht und möglicherweise auf einen kompensatorischen Zusammenhang zwischen diesen beiden anti-inflammatorischen Adipokinen hinweist.

#### **4.2 Versuche zur anti-inflammatorischen Wirkung von CTRP-3 *in vivo***

In den durchgeführten Versuchen in C57BL/6N Mäusen konnte die an Adipozyten und Monozyten *in vitro* eingehend untersuchte und auch im Tiermodell bereits einmal gezeigte Rolle von CTRP-3 als Antagonist von LPS-induzierter Entzündung bestätigt werden. Besonderes Augenmerk galt dabei der Auswirkung des applizierten rekombinanten Adipokins auf die Genexpression des Zytokins IL-6 und des Chemokins MIP-2 im Fettgewebe sowie auf

die jeweiligen Proteinkonzentrationen im Blutserum der Versuchstiere. Die Expression von IL-6 im epididymalen Fettgewebe wurde durch eine der LPS-Gabe um 30 min vorausgehende intraperitoneale Injektion von rekombinantem CTRP-3 leicht verringert. Wahrscheinlich aufgrund der recht großen Schwankungsbreite der Ergebnisse war dieser Effekt nicht statistisch signifikant. Bei den Serumspiegeln von IL-6 und MIP-2 zeigte sich hingegen jeweils eine deutliche und signifikante Verminderung der nach LPS-Gabe stark erhöhten Konzentrationen durch Vorbehandlung mit CTRP-3. Die Beobachtung, dass sich die anti-inflammatorische Wirkung des Adipokins in den Serumspiegeln der beiden Faktoren deutlicher zeigte als in den Konzentrationen der entsprechenden mRNAs im Fettgewebe, könnte auf eine direkte oder indirekte destabilisierende Wirkung von CTRP-3 auf die zirkulierenden pro-inflammatorischen Proteine, zusätzlich zu einer Inhibition ihrer Synthese im Fettgewebe, hindeuten. Möglicherweise sind die verringerten Serumkonzentrationen von IL-6 und MIP-2 auch auf eine Verminderung ihrer Expression in peritonealen Makrophagen durch CTRP-3 zurückzuführen. Der inhibitorische Effekt von CTRP-3 auf die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 wurde im Western Blot gezeigt und dieses Protein damit als Antagonist intrazellulärer inflammatorischer Signalwege bestätigt.

Ferner wurde gezeigt, dass die entzündungshemmende Wirkung des Adipokins stark abhängig vom Ort seiner Applikation war. So hatte die Injektion von CTRP-3 in die Schwanzvene von Versuchstieren keine Auswirkungen auf die durch intraperitoneale LPS-Gabe induzierten pro-inflammatorischen Veränderungen in der adipozytären Genexpression und im Blutserum. Möglicherweise wird bei einer Applikation des Proteins in die Bauchhöhle seine Präsenz in den von der LPS-Stimulation betroffenen Organen und insbesondere im Fettgewebe in höherer Konzentration und/oder kürzerer Zeit gewährleistet als bei Injektion in den Blutkreislauf. Zur Prüfung dieser Hypothese sind weitere analoge Experimente mit längeren Zeiten für die Vorinkubation mit CTRP-3 notwendig, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ausgeführt wurden.

#### **4.3 Versuche zur rekombinanten Expression der globulären Domäne von CTRP-3 (gCTRP-3) in eukaryotischen Zellen**

Die trotz nachgewiesener Transfektion der codierenden DNA in H5 und HEK293T/17 Zellen erfolglosen Versuche einer Expression von gCTRP-3 lassen vermuten, dass das rekombinante Protein aus Signalpeptid und globulärer Domäne möglicherweise unter intrazellulären Bedingungen fehlerhaft gefaltet, instabil und/oder zytotoxisch ist. Eine weitere Erklärung

könnte eine aus der Verkürzung des Transkripts resultierende Inhibition des Biosyntheseprozesses sein. Zur genaueren Klärung des Sachverhaltes ist ein detaillierter molekularbiologischer Ansatz erforderlich, der im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnte.

#### **4.4 Expression und Funktion von CTRP-5 in Adipozyten**

Die vorliegenden experimentellen Ergebnisse zeigten die Expression von CTRP-5 in humanem und murinem Fettgewebe, in primären humanen Adipozyten und in der murinen Zelllinie 3T3-L1. Neben der bereits in früheren Publikationen [72, 95] beschriebenen Synthese in Gesamt-Fettgewebe sowie in Zellen der stromavaskulären Fraktion konnte diese nun auch in isolierten Adipozyten nachgewiesen werden. Bei den murinen 3T3-L1 Zellen war das Fehlen von CTRP-5 in Präadipozyten sowie eine starke Induktion seiner Genexpression und Proteinsynthese im Zuge der adipozytären Differenzierung zu beobachten. Diese Befunde legen eine Einordnung dieses Proteins in die Reihe der klassischen Adipokine mit den prominenten Vertretern Adiponektin und Leptin nahe. Zugleich bleibt zu bedenken, dass die Synthese und Sekretion von CTRP-5 außer in Adipozyten bereits auch in Muskelzellen nachgewiesen wurde [145]. Interessanterweise traten deutliche Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen der 3T3-L1 Zelllinie und den untersuchten primären humanen Zellen auf, bei letzteren wiesen sowohl Präadipozyten als auch reife Fettzellen gut detektierbare Mengen an CTRP-5 mRNA und Protein auf. Daher ist es möglich, dass es sich bei der beobachteten Induktion der Expression von CTRP-5 während der Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten um ein für dieses Zellmodell oder generell für murine Adipozyten spezifisches, im menschlichen Organismus hingegen nicht auftretendes Phänomen handeln könnte. In diese Richtung deutet auch die beobachtete vergleichsweise schwache Expression in humanem Fettgewebe.

Die Untersuchungen zur Expression von CTRP-5 in 3T3-L1 Adipozyten zeigten einen induzierenden Effekt der in der Nahrung vorkommenden gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure. Des Weiteren hatte CTRP-5 einen regulatorischen Einfluss auf die Sekretion von Adiponektin und Resistin. Diese Ergebnisse lassen eine potentiell bedeutsame Rolle dieses Adipokins in metabolischen Erkrankungen vermuten. Für weitere Nachforschungen in dieser Richtung wird ein für quantitative Messungen geeigneter, verlässlicher ELISA Kit für murines CTRP-5 erforderlich sein, um den Einfluss der genannten Fettsäuren auf die Synthese

und Sekretion des Proteins und damit die effektive Wirksamkeit der beobachteten Steigerung der Genexpression untersuchen zu können.

Bereits in früheren Publikationen wurde die Bedeutung von CTRP-5 als Mediator im Kontext des Metabolischen Syndroms und seiner Krankheitsbilder herausgestellt [146]. Hierin besteht eine Parallele zu der Rolle von CTRP-3 in inflammatorischen Prozessen und im Glukose-Metabolismus unter den Bedingungen von Übergewicht und Adipositas [58, 146]. Der nahe liegende Gedanke eines regulatorischen Zusammenhanges zwischen den beiden Adipokinen wurde durch einen siRNA-vermittelten *knockdown* der CTRP-3 Synthese in 3T3-L1 Adipozyten überprüft. Dabei kam es zu einer Induktion der CTRP-5 Genexpression parallel zur Inhibition von CTRP-3. In dieser Beobachtung könnte eine Erklärung für die Steigerung der CTRP-5 Expression während der adipozytären Differenzierung in 3T3-L1 Zellen liegen, während der CTRP-3 zunächst nur in geringen Mengen gebildet wird. Möglicherweise handelt es sich bei der erhöhten Synthese von CTRP-5 auch um einen kompensatorischen Effekt in Reaktion auf die Verringerung der CTRP-3 Expression. Eine weitere denkbare Interpretation bietet die Hypothese, dass CTRP-3 in seiner normalen intrazellulären Konzentration als wirksamer Inhibitor der Expression von CTRP-5 agiert und diese Funktion nach dem *knockdown* nicht länger hinreichend erfüllt. Eine verlässliche Klärung dieser Fragestellung wird Stimulationsversuche mit beiden Adipokinen sowie weitergehende und detailliertere Studien auf molekularer Ebene erfordern.

CTRP-5 wurde durch Messungen via ELISA in den Blutseren von 50 gesunden Probanden nachgewiesen, womit ein wichtiger Beleg für seinen Status als zirkulierendes Adipokin erbracht wurde. Die zwischen den Individuen stark variierenden Konzentrationen lagen in einem Bereich von knapp unter 100 bis über 1000 ng/ml. Dabei wurden keine signifikanten Korrelationen der Serumspiegel von CTRP-5 mit anthropometrischen Parametern wie BMI, Geschlecht oder Alter gefunden. Da es sich bei den untersuchten Probanden um eine relativ kleine Gruppe handelte, sollten diese Ergebnisse durch weitere Studien in größeren und metabolisch klarer definierten Kollektiven überprüft werden. Eine zukünftige detailliertere Untersuchung möglicher Korrelationen von CTRP-5 mit metabolischen Parametern in humanen Kollektiven erscheint vor dem Hintergrund der gezeigten Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten vielversprechend.

Eine von Yamada et al. veröffentlichte Studie beschreibt für ein japanisches Kollektiv aus 2417 Probanden (895 gesunde Kontrollpersonen, 1522 Patienten mit Metabolischem Syndrom) eine positive Korrelation zwischen dem Vorliegen der Punktmutation 1014T→A (SNP rs9640) in der 3'-*downstream* Region des CTRP-5 Gens und einer erhöhten Prävalenz

des Metabolischen Syndroms [135]. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Ergebnissen einer früheren Untersuchung, die auf der Basis von *Microarray* Analysen in einem kleinen Kollektiv nordamerikanischer Ureinwohner (20 normalgewichtige und 19 übergewichtige Personen) eine Assoziation der CTRP-5 Expression mit einer Prädisposition für die Entwicklung von Übergewicht feststellte [95]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einer vergleichenden Studie 100 gesunde Probanden sowie 100 Patienten mit diagnostiziertem Typ 2 Diabetes genotypisiert. Wie in der zitierten japanischen Studie wurde die Punktmutation 1014T→A gefunden, allerdings deutlich häufiger und gleichmäßig verteilt im Kontroll- und im Patientenkollektiv. Zudem wurden dabei, anders als in der Studie von Yamada et al., auch homozygote Träger des SNP (Genotyp AA) gefunden. Insgesamt befand sich die Verteilung der Allele T und A in den beiden untersuchten Gruppen in einem Gleichgewicht nach der Formel von Hardy und Weinberg [136, 137]. Eine Assoziation des SNP rs9640 mit Typ 2 Diabetes wurde somit im Rahmen dieser Untersuchungen nicht bestätigt, wobei sicherlich die vergleichsweise geringe Größe (jeweils  $n = 100$ ) der hier analysierten Kollektive zu berücksichtigen ist. Die widersprüchlichen Ergebnisse der beiden Studien sind möglicherweise durch die ethnischen Unterschiede zwischen den genotypisierten asiatischen und europäischen Gruppen zu erklären. So wird etwa in der Datenbank *dbSNP* die Häufigkeit der hier untersuchten Punktmutation A für die japanische Bevölkerung mit 7% angegeben, für Europäer hingegen mit 14-16%. Dementsprechend lag die Allelhäufigkeit von A auch in den hier genotypisierten Kollektiven bei 14% (Diabetiker) und 16% (gesunde Probanden).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In dem auf 3T3-L1 Fibroblasten basierenden adipozytären Zellkulturmodell wurden Hinweise auf einen anti-inflammatorischen Einfluss der ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Linolsäure gefunden, der sich in einer Verringerung der extrazellulären Konzentrationen der Zytokine CCL2 und IL-8 äußerte. Die Sekretion des ebenfalls pro-inflammatorisch wirksamen Adipokins Chemerin aus Adipozyten wurde hingegen durch die Stimulation mit diesen Fettsäuren induziert. Das an 100 gesunden Probanden durchgeführte Experiment zu kurzfristig erhöhter Fettbelastung im Menschen zeigte eine negative Regulation mehrerer in den systemischen Inflamationsprozess involvierter sekretorischer Proteine durch die zugeführten Triglyzeride. Die Serumkonzentrationen von CCL2 und Chemerin gingen leicht zurück, deutlicher waren die Auswirkungen der Fettbelastung auf IL-8, dessen durchschnittlicher Serumspiegel nach 6 h auf weniger als die Hälfte des basalen Wertes gesunken war. Die Beobachtungen *in vitro* und *in vivo* legen eine sehr differentielle Rolle gesättigter und ungesättigter Fettsäuren im Kontext lokaler und systemischer Inflammation nahe.

Im Gesamtkollektiv wurden vom BMI und vom Geschlecht abhängige Unterschiede in der zirkulierenden Chemerinkonzentration sowie in ihren Korrelationen mit anderen Serumparametern festgestellt. Versuche *in vitro* lieferten Hinweise darauf, dass der Geschlechtsunterschied im Chemerinspiegel möglicherweise u. a. durch das Sexualhormon Testosteron vermittelt wird.

Aufbauend auf vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe zur Charakterisierung des zu Adiponektin paralogen Adipokins CTRP-3 *in vitro* wurden dessen anti-inflammatorischen Eigenschaften in einem LPS-induzierten murinen Entzündungsmodell getestet. Dabei bewirkte eine intraperitoneale Applikation des in H5 Zellen exprimierten rekombinanten Proteins eine negative Regulation der zirkulierenden Konzentrationen der pro-inflammatorischen Faktoren IL-6 und MIP-2 und eine schwache Inhibition der Genexpression von IL-6 in epididymalem Fettgewebe. Nach intravenöser Injektion des Adipokins wurde dieser entzündungshemmende Effekt hingegen nicht beobachtet. Die Daten zeigen, dass CTRP-3 die in kultivierten Adipozyten und Monozyten festgestellte anti-inflammatorische Wirkung auch im lebenden Organismus entfaltet, mit einem deutlich stärkeren und/oder schneller wirkenden Einfluss von direkt am Ort der lokalen Inflammation appliziertem im Vergleich zu zirkulierendem Protein. Diese Ergebnisse bekräftigen eine mögliche Rolle von

CTRP-3 als künftiges *drug target* im Kontext der Komorbiditäten des Metabolischen Syndroms.

Ein zusätzlich verfolgter Ansatz zur Synthese der globulären Domäne von CTRP-3 (gCTRP-3) verlief erfolglos, da das in eukaryotische Zellen der Linien H5 und HEK293T/17 eingeführte Genkonstrukt von diesen nicht in ausreichender Menge exprimiert wurde oder das gebildete Protein zu instabil war. Die beabsichtigte Reinigung der rekombinanten Domäne aus den verwendeten zellulären Expressionssystemen zur Prüfung ihrer Bedeutung für die anti-inflammatorische Wirkung von CTRP-3 konnte daher nicht erfolgen.

Das Protein CTRP-5 wurde in der vorliegenden Arbeit als u. a. vom Fettgewebe gebildetes und sezerniertes, im humanen Blutkreislauf zirkulierendes Adipokin charakterisiert. Seine Expression wurde sowohl in primären humanen Zellen als auch in der murinen Zelllinie 3T3-L1 gezeigt. Die in einer früheren Veröffentlichung beschriebene Assoziation einer Punktmutation am Genlocus von CTRP-5 mit einer erhöhten Prävalenz des Metabolischen Syndroms wurde in einer durchgeführten vergleichenden Studie nicht bestätigt. Gleichwohl deuten die Ergebnisse von Experimenten an murinen Adipozyten *in vitro* auf wichtige Funktionen dieses Adipokins in der Fettzellbiologie hin, die sich u. a. in einem Einfluss auf die Sekretion im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom bedeutsamer Proteine äußern könnten. Des Weiteren wurden Hinweise auf einen regulatorischen Zusammenhang, möglicherweise in Form einer negativen Rückkopplung, mit der Genexpression des nahe verwandten Adipokins CTRP-3 gefunden.



## 6 PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

### 6.1 Publikationen

#### 6.1.1 Erstautorenschaften

**Schmid A**, Kopp A, Aslanidis C, Wabitsch M, Müller M, Schäffler A: Regulation and function of C1Q/TNF-related protein-5 (CTRP-5) in the context of adipocyte biology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013; 121(5):310-7

**Schmid A**, Kopp A, Hanses F, Bala M, Müller M, Schäffler A: The novel adipokine C1q/TNF-related protein-3 is expressed in human adipocytes and regulated by metabolic and infection-related parameters. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012; 120(10):611-7

#### 6.1.2 Koautorenschaften

Krautbauer S, Wanninger J, Eisinger K, Hader Y, Beck M, Kopp A, **Schmid A**, Weiss TS, Dorn C, Buechler C: Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver. *Exp Mol Pathol.* 2013; 95(2):199-205

Bauer S, Bala M, Kopp A, Eisinger K, **Schmid A**, Schneider S, Neumeier M, Buechler C: Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo. *Eur J Clin Invest.* 2012; 42(11):1213-20

### 6.2 Kongressbeiträge

**Schmid A**, Kopp A, Hanses F, Bala M, Schäffler A: C1q/TNF-related protein-3 is expressed in adipose tissue, circulates in human sera, and is regulated by metabolic and infection-related parameters. Posterbeitrag

55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Mannheim, 07.-10.03.2012

**Schmid A**, Kopp A, Hanses F, Bala M, Müller M, Schäffler A: C1q/TNF-Related Protein-3 wird in Fettgewebe exprimiert und durch Stoffwechselfaktoren und Infektions-relevante Parameter reguliert. Posterbeitrag

118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 14.-17.04.2012

**Schmid A**, Kopp A, Bala M, Leszczak S, Ober I, Buechler C, Schäffler A: Gender-specific regulation of the adipokine chemerin. Posterbeitrag

5th International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome, Wien, 18.-20.04.2013

---

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Christa Büchler für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die jederzeit hilfsbereite, freundliche und kompetente Betreuung dieser Arbeit und für die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis vielmals für die Betreuung und stets hilfsbereite Unterstützung als Mentor.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Schäffler, der mir bei meiner Arbeit als betreuender Mentor immer unterstützend und beratend zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Richard Warth danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und für seine Teilnahme am Prüfungsausschuss als zweiter Prüfer.

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann danke ich für die Bereitschaft, als dritter Prüfer dem Prüfungsausschuss beizutreten.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Wirth bedanke ich mich dafür, dass er für den Vorsitz des Prüfungsausschusses zur Verfügung steht.

Herrn Dr. Philipp Gross danke ich für die Bereitstellung des Expressionsvektors pIRESneo und die Beratung bei der Durchführung von Transfektionsversuchen.

Bei Herrn Dr. Frank Hanses und Frau Irina Fink möchte ich mich vielmals für die organisatorische und praktische Unterstützung bei den durchgeführten Tierversuchen bedanken.

Mein herzlicher Dank geht auch an Frau Dr. Margarita Bala, Frau Stephanie Leszczak und Frau Irene Ober für den Aufbau des Fettbelastungs-Kollektivs und für eine schöne Zeit im Labor.

Meinen Laborkolleginnen Carina Heinrich, Kerstin Neumeier und ganz besonders Dr. Andrea Kopp danke ich von Herzen für die freundliche Aufnahme und die tatkräftige Unterstützung im Labor und überhaupt für eine sehr schöne und angenehme Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren. Vielen Dank richte ich auch an Dr. Markus Neumeier für die freundliche Unterstützung als „externer Berater“ bei verschiedenen Versuchen. Ich wünsche Euch alles Gute und insbesondere Andrea, Kerstin und Markus eine schnelle Eingewöhnung an neuer Wirkungsstätte und eine glückliche Zeit in Ravensburg!

Sehr dankbar bin ich auch allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen im H4 bzw. später im Biopark: Dr. Sabrina Krautbauer, Kristina Eisinger, Yvonne Hader, Tanja Späth, Roland Walter, Dr. Thomas Karrasch und allen, die dort während der letzten Jahre im Rahmen von Medizin-Dissertationen, Praktika oder Bachelor-Arbeiten im Labor mitgewirkt haben. Danke für Eure Hilfsbereitschaft in allen Angelegenheiten und für die schöne Zusammenarbeit!

Ich bedanke mich bei allen meinen Freunden, die mich bei oder neben meiner Arbeit unterstützt und mein Leben bereichert haben. Meine tiefe Verbundenheit möchte ich insbesondere meinem alten Studienfreund Florian aussprechen, der immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte und in biochemischen wie in philosophischen Fragen ein kompetenter Diskussionspartner war. Danke Flo, für die schönen gemeinsamen Jahre in Regensburg!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Christine und Manfred und meinem Bruder Christian. Ihr wart in den vergangenen Jahren wie schon mein ganzes Leben lang immer für mich da, wart mir ein sicherer Rückhalt und habt mich bedingungslos unterstützt, habt gute Zeiten noch schöner gemacht und mir durch schwere hindurch geholfen. Ihr seid die beste Familie, die ich mir wünschen kann!

Diese Arbeit wurde mit der finanziellen Unterstützung der DFG (BU 1141/7-1 und SCHA 789/4-2) durchgeführt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Regensburg, den 14.01.2014

---

Andreas Schmid

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Grundy, S.M., et al., *Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition*. Circulation, 2004. **109**(3): p. 433-8.
2. James, P.T., et al., *The worldwide obesity epidemic*. Obes Res, 2001. **9 Suppl 4**: p. 228S-233S.
3. Prentice, A.M., *The emerging epidemic of obesity in developing countries*. Int J Epidemiol, 2006. **35**(1): p. 93-9.
4. Bluher, M., *The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals*. Curr Opin Lipidol, 2010. **21**(1): p. 38-43.
5. Popkin, B.M. and P. Gordon-Larsen, *The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28 Suppl 3**: p. S2-9.
6. Hebebrand, J., et al., *Molecular genetic aspects of weight regulation*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(19): p. 338-44.
7. Martin-Gronert, M.S. and S.E. Ozanne, *Early life programming of obesity*. Med Wieku Rozwoj, 2013. **17**(1): p. 7-12.
8. Greenberg, A.S. and M.S. Obin, *Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 461S-465S.
9. Bluher, M., *Adipose tissue dysfunction in obesity*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009. **117**(6): p. 241-50.
10. Monteiro, R. and I. Azevedo, *Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**.
11. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 1233-60.
12. Chechi, K., J. Nedergaard, and D. Richard, *Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans*. Obes Rev, 2013.
13. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(4): p. 332-41.
14. Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 818-27.
15. Cinti, S., *Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(5): p. E977-86.
16. Lekstrom-Himes, J. and K.G. Xanthopoulos, *Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28545-8.
17. Valet, P., et al., *Understanding adipose tissue development from transgenic animal models*. J Lipid Res, 2002. **43**(6): p. 835-60.
18. Rosen, E.D., et al., *Transcriptional regulation of adipogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1293-307.
19. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-56.
20. Tontonoz, P., et al., *ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4753-9.

21. Cederberg, A., et al., *FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance*. Cell, 2001. **106**(5): p. 563-73.
22. Timmons, J.A., et al., *Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4401-6.
23. Seale, P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch*. Nature, 2008. **454**(7207): p. 961-7.
24. Young, P., J.R. Arch, and M. Ashwell, *Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse*. FEBS Lett, 1984. **167**(1): p. 10-4.
25. Himms-Hagen, J., et al., *Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(3): p. C670-81.
26. Barbatelli, G., et al., *The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(6): p. E1244-53.
27. Rosenwald, M., et al., *Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(6): p. 659-67.
28. Lee, Y.H., et al., *In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding*. Cell Metab, 2012. **15**(4): p. 480-91.
29. Bostrom, P., et al., *A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 463-8.
30. Lowe, M.E., *The triglyceride lipases of the pancreas*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 2007-16.
31. Friedman, H.I. and B. Nylund, *Intestinal fat digestion, absorption, and transport. A review*. Am J Clin Nutr, 1980. **33**(5): p. 1108-39.
32. Black, D.D., *Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(3): p. G519-24.
33. Brasaemle, D.L., *Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2547-59.
34. Wolfe, R.R., *Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(3 Suppl): p. 519S-526S.
35. Houten, S.M. and R.J. Wanders, *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation*. J Inherit Metab Dis, 2010. **33**(5): p. 469-77.
36. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchon, *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. **26**(6): p. 711-23.
37. Brown, G.C., *Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells*. Biochem J, 1992. **284** ( Pt 1): p. 1-13.
38. Hatefi, Y., *ATP synthesis in mitochondria*. Eur J Biochem, 1993. **218**(3): p. 759-67.
39. Ferris, W.F. and N.J. Crowther, *Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue*. Cardiovasc J Afr, 2011. **22**(3): p. 147-54.
40. Trayhurn, P. and C. Bing, *Appetite and energy balance signals from adipocytes*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1471): p. 1237-49.
41. Kotnik, P., P. Fischer-Posovszky, and M. Wabitsch, *RBP4: a controversial adipokine*. Eur J Endocrinol, 2011. **165**(5): p. 703-11.
42. Taube, A., et al., *Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(11): p. H2148-65.

43. Al-Suhaimi, E.A. and A. Shehzad, *Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity*. Eur J Med Res, 2013. **18**: p. 12.
44. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1784-92.
45. Lee, H., I.S. Lee, and R. Choue, *Obesity, Inflammation and Diet*. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2013. **16**(3): p. 143-152.
46. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science, 2005. **307**(5708): p. 426-30.
47. Bala, M., et al., *In vivo suppression of visfatin by oral glucose uptake: evidence for a novel incretin-like effect by glucagon-like peptide-1 (GLP-1)*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(8): p. 2493-501.
48. Suganami, T. and Y. Ogawa, *Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 33-9.
49. You, T., et al., *The metabolic syndrome is associated with circulating adipokines in older adults across a wide range of adiposity*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008. **63**(4): p. 414-9.
50. Bogdanova, K., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)--a novel common aspect of the metabolic syndrome*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2006. **150**(1): p. 101-4.
51. Asrih, M. and F.R. Jornayvaz, *Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance*. J Endocrinol, 2013. **218**(3): p. R25-36.
52. Martins, A.R., et al., *Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function*. Lipids Health Dis, 2012. **11**: p. 30.
53. Guilherme, A., et al., *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 367-77.
54. Ouchi, N. and K. Walsh, *Adiponectin as an anti-inflammatory factor*. Clin Chim Acta, 2007. **380**(1-2): p. 24-30.
55. Hofmann, C., et al., *Clq/TNF-related protein-3 (CTRP-3) is secreted by visceral adipose tissue and exerts antiinflammatory and antifibrotic effects in primary human colonic fibroblasts*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(12): p. 2462-71.
56. Fantuzzi, G., *Adiponectin and inflammation: consensus and controversy*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(2): p. 326-30.
57. Wolfing, B., et al., *Effects of the new Clq/TNF-related protein (CTRP-3) "cartonectin" on the adipocytic secretion of adipokines*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(7): p. 1481-6.
58. Kopp, A., et al., *Clq/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5267-78.
59. Kishore, U., et al., *Clq and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility*. Trends Immunol, 2004. **25**(10): p. 551-61.
60. Waki, H., et al., *Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40352-63.
61. Basu, R., et al., *Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2174-7.
62. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to Clq, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
63. Shapiro, L. and P.E. Scherer, *The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor*. Curr Biol, 1998. **8**(6): p. 335-8.



- 
64. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 939-49.
  65. Ye, R. and P.E. Scherer, *Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity?* Mol Metab, 2013. **2**(3): p. 133-141.
  66. Kern, P.A., et al., *Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1779-85.
  67. Bruun, J.M., et al., *Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(3): p. E527-33.
  68. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(3): p. 267-78.
  69. Matsuzawa, Y., *Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2010. **86**(2): p. 131-41.
  70. Robinson, K., J. Prins, and B. Venkatesh, *Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness*. Crit Care, 2011. **15**(2): p. 221.
  71. Kim, K.Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increases CTRP1 expression in adipose tissue*. FEBS Lett, 2006. **580**(16): p. 3953-60.
  72. Wong, G.W., et al., *Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions*. Biochem J, 2008. **416**(2): p. 161-77.
  73. Innamorati, G., et al., *GIP, a G-protein-coupled receptor interacting protein*. Regul Pept, 2002. **109**(1-3): p. 173-9.
  74. Jeon, J.H., et al., *A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production*. FASEB J, 2008. **22**(5): p. 1502-11.
  75. Lasser, G., et al., *C1qTNF-related protein-1 (CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen*. Blood, 2006. **107**(2): p. 423-30.
  76. Wong, G.W., et al., *A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10302-7.
  77. Li, Q., et al., *Identification of C1qTNF-related protein 4 as a potential cytokine that stimulates the STAT3 and NF-kappaB pathways and promotes cell survival in human cancer cells*. Cancer Lett, 2011. **308**(2): p. 203-14.
  78. Kim, M.J., et al., *C1qTNF-related protein-6 increases the expression of interleukin-10 in macrophages*. Molecules and Cells, 2010. **30**(1): p. 59-64.
  79. Cooper, J.D., et al., *Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1399-401.
  80. Eyre, S., et al., *Overlapping genetic susceptibility variants between three autoimmune disorders: rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and coeliac disease*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(5): p. R175.
  81. Takeuchi, T., Y. Adachi, and T. Nagayama, *Expression of a secretory protein C1qTNF6, a C1qTNF family member, in hepatocellular carcinoma*. Anal Cell Pathol (Amst), 2011. **34**(3): p. 113-21.
  82. Dick, D.M., et al., *Genome-wide association study of conduct disorder symptomatology*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(8): p. 800-8.
  83. Peterson, J.M., Z. Wei, and G.W. Wong, *CTRP8 and CTRP9B are novel proteins that hetero-oligomerize with C1q/TNF family members*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(2): p. 360-5.

84. Berube, N.G., et al., *Cloning and characterization of CRF, a novel C1q-related factor, expressed in areas of the brain involved in motor function*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **63**(2): p. 233-40.
85. Wong, G.W., et al., *Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin*. FASEB J, 2009. **23**(1): p. 241-58.
86. Zheng, Q., et al., *C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(11): p. 2616-23.
87. Wei, Z., J.M. Peterson, and G.W. Wong, *Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation OF AMP-activated protein kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 15652-65.
88. Maeda, T., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel gene, CORS26, encoding a putative secretory protein and its possible involvement in skeletal development*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3628-34.
89. Schaffler, A., et al., *Genomic organization, promoter, amino acid sequence, chromosomal localization, and expression of the human gene for CORS-26 (collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein)*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1630**(2-3): p. 123-9.
90. Weigert, J., et al., *The adiponectin paralog CORS-26 has anti-inflammatory properties and is produced by human monocytic cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5565-70.
91. Schaffler, A., et al., *Regulation and function of collagenous repeat containing sequence of 26-kDa protein gene product "cartonectin"*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(2): p. 303-13.
92. Compton, S.A. and B. Cheatham, *CTRP-3: blocking a toll booth to obesity-related inflammation*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5095-7.
93. Kopp, A., et al., *Effects of the new adiponectin paralogous protein CTRP-3 and of LPS on cytokine release from monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus*. Cytokine, 2010. **49**(1): p. 51-7.
94. Peterson, J.M., Z. Wei, and G.W. Wong, *C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output*. J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 39691-701.
95. Lee, Y.H., et al., *Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes*. Diabetologia, 2005. **48**(9): p. 1776-83.
96. Ayyagari, R., et al., *Late-onset macular degeneration and long anterior lens zonules result from a CTRP5 gene mutation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(9): p. 3363-71.
97. Mandal, M.N., et al., *CTRP5 is a membrane-associated and secretory protein in the RPE and ciliary body and the S163R mutation of CTRP5 impairs its secretion*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(12): p. 5505-13.
98. Park, S.Y., et al., *C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 is increased in mitochondrial DNA-depleted myocytes and activates AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 27780-9.
99. Hayward, C., et al., *Mutation in a short-chain collagen gene, CTRP5, results in extracellular deposit formation in late-onset retinal degeneration: a genetic model for age-related macular degeneration*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2657-67.
100. Borooah, S., et al., *Republished review. [corrected] Late-onset retinal macular degeneration: clinical insights into an inherited retinal degeneration*. Postgrad Med J, 2009. **85**(1007): p. 495-500.

101. Shu, X., et al., *Disease mechanisms in late-onset retinal macular degeneration associated with mutation in C1QTNF5*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(10): p. 1680-9.
102. Stefan, N., et al., *Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans*. Arch Intern Med, 2008. **168**(15): p. 1609-16.
103. Fain, J.N., *Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 513948.
104. Gerhardt, C.C., et al., *Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **175**(1-2): p. 81-92.
105. Fain, J.N., et al., *The inflammatory response seen when human omental adipose tissue explants are incubated in primary culture is not dependent upon albumin and is primarily in the nonfat cells*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**: p. 4.
106. Boisvert, W.A., *Modulation of atherogenesis by chemokines*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(4): p. 161-5.
107. Ito, A., et al., *Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35715-23.
108. Goralski, K.B., et al., *Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28175-88.
109. Bauer, S., et al., *Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo*. Eur J Clin Invest, 2012. **42**(11): p. 1213-20.
110. Stefanov, T., et al., *Circulating chemerin decreases in response to a combined strength and endurance training*. Endocrine, 2013.
111. Ernst, M.C. and C.J. Sinal, *Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(11): p. 660-7.
112. Takahashi, M., et al., *Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. FEBS Lett, 2008. **582**(5): p. 573-8.
113. Becker, M., et al., *Expression of human chemerin induces insulin resistance in the skeletal muscle but does not affect weight, lipid levels, and atherosclerosis in LDL receptor knockout mice on high-fat diet*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2898-903.
114. Eisinger, K., et al., *Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Exp Mol Pathol, 2012. **92**(1): p. 90-6.
115. Bremer, A.A. and I. Jialal, *Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome*. J Obes, 2013. **2013**: p. 393192.
116. Weigert, J., et al., *Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **72**(3): p. 342-8.
117. Lehrke, M., et al., *Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(2): p. 339-44.
118. Luangsang, S., et al., *Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6489-99.
119. Evans, K., M.L. Clark, and K.N. Frayn, *Effects of an oral and intravenous fat load on adipose tissue and forearm lipid metabolism*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. E241-8.
120. Henkel, E., et al., *Impact of glucagon response on postprandial hyperglycemia in men with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus*. Metabolism, 2005. **54**(9): p. 1168-73.
121. Kopp, A., *Molekulare und funktionelle Charakterisierung des Adipokins C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3)*. Dissertation. 2011.

122. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
123. Heukeshoven, J. and R. Dernick, *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. Electrophoresis, 1988. **9**(1): p. 28-32.
124. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
125. Karrasch T., e.a., *Short-term regulation of visfatin release in vivo by oral lipid ingestion and in vitro by fatty acid stimulation*. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, in press, 2013.
126. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
127. Green, H. and O. Kehinde, *An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion*. Cell, 1975. **5**(1): p. 19-27.
128. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3122S-3126S.
129. Birnboim, H.C., *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol, 1983. **100**: p. 243-55.
130. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
131. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
132. Mello, C.C. and D. Conte, Jr., *Revealing the world of RNA interference*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 338-42.
133. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
134. Schmid, A., et al., *Regulation and function of C1Q/TNF-related protein-5 (CTRP-5) in the context of adipocyte biology*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2013. **121**(5): p. 310-7.
135. Yamada, Y., et al., *Genetic risk for metabolic syndrome: examination of candidate gene polymorphisms related to lipid metabolism in Japanese people*. J Med Genet, 2008. **45**(1): p. 22-8.
136. Hardy, G.H., *Mendelian Proportions in a Mixed Population*. Science, 1908. **28**(706): p. 49-50.
137. Weinberg, W., *Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen*. Jahrbefte des Vereines für Vaterländische Naturkunde in Württemberg, 1908.
138. Bauer, S., et al., *Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes*. Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 26-35.
139. Zabel, B.A., et al., *Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34661-6.
140. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 3085-8.
141. Takahashi, M., et al., *Decreased serum chemerin levels in male Japanese patients with type 2 diabetes: sex dimorphism*. Endocr J, 2013. **60**(1): p. 37-44.
142. Utsal, L., et al., *Elevated serum IL-6, IL-8, MCP-1, CRP, and IFN-gamma levels in 10- to 11-year-old boys with increased BMI*. Horm Res Paediatr, 2012. **78**(1): p. 31-9.
143. Roberts, C.K., et al., *Effects of an intensive short-term diet and exercise intervention: comparison between normal-weight and obese children*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013. **305**(5): p. R552-7.

- 
144. Izadpanah, A., et al., *A short-term diet and exercise intervention ameliorates inflammation and markers of metabolic health in overweight/obese children*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **303**(4): p. E542-50.
  145. Lim, S., et al., *Effects of aerobic exercise training on C1q tumor necrosis factor alpha-related protein isoform 5 (myonectin): association with insulin resistance and mitochondrial DNA density in women*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(1): p. E88-93.
  146. Schaffler, A. and C. Buechler, *CTRP family: linking immunity to metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(4): p. 194-204.